

**Produktion einer polyesterspaltenden Hydrolase in *E. coli* und
vergleichende Untersuchungen zum Abbaumechanismus
an Polyestern**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Karolin Dresler
aus Schwerin

1. Referent:	apl. Professor Dr. Siegmund Lang
2. Referent:	Professor Dr. An-Ping Zeng
eingereicht am:	02.05.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am:	16.07.2007

Druckjahr 2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Dresler K., van den Heuvel J., Müller R.J., Deckwer W.D. Production of a recombinant polyester-cleaving hydrolase from *Thermobifida fusca* in *Escherichia coli*. Bioprocess Biosyst. Eng., 29: 169-183 (2006).

Tagungsbeiträge:

Dresler K., van den Heuvel J., Müller R.J., Deckwer W.D. Production of a hydrolase from *Thermobifida fusca* in *Escherichia coli* and its application to polyester degradation. (Poster) VAAM-Jahrestagung, Jena (2005).

Dresler K., Müller R.J., Deckwer W.D. Biological treatment of plastic waste. (Poster und Vortrag) International Circular Economy Exposition, Suzhou, China (2006).

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von Mai 2003 bis April 2007 im Bereich Biochemical Engineering am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (ehemals GBF). Die Erstellung der Arbeit fand im Rahmen des Projektes der Deutschen Forschungsgemeinschaft „Enzymatischer Abbau synthetischer Polyester“ statt, die die Finanzierung der Arbeit übernommen hat.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Professor Wolf-Dieter Deckwer für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, sein reges Interesse, sowie für die fruchtbaren und motivierenden Diskussionen. Leider verstarb Professor Wolf-Dieter Deckwer unerwartet im Oktober letzten Jahres und konnte die Dissertation nicht zu Ende begleiten.

Besonders herzlich möchte ich Professor Siegmund Lang für die kurzfristige Übernahme der abschließenden Betreuung meiner Arbeit danken.

Weiterhin danke ich Professor An-Ping Zeng für die Übernahme des Coreferates und Privatdozent Udo Rau für die Bereitschaft den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Ein großes Dankeschön geht auch an Dr. Rolf-Joachim Müller für die zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen während der Anfertigung der Arbeit sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Dr. Joop van den Heuvel für die Unterstützung bei der Konstruktion des Expressionsvektors, Dr. Joachim Reichelt bei der Generierung des Proteinmodells, Rita Getzlaff für die Sequenzierungsarbeiten und Dr. Heinrich Lünsdorf für die Anfertigung der transelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit möchte ich mich bei Hedwig Schrader und Petra Westphal bedanken.

Bei meinen jetzigen und ehemaligen Mitstreitern Dr. Yang Yang Malten, Dr. Johannes Leonhäuser, Dr. Rajan Hollmann, Monika Gersch, Tobias Fürch, Dr. Wei Wang und Dominik Sieblitz möchte ich mich für die moralische und fachliche Unterstützung bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden ganz herzlich für die stetige Aufmunterung besonders in der Endphase meiner Arbeit bedanken. Ein besonderes Dankeschön geht auch an meine Eltern Gerd und Monika Dresler, die mich immer nach Herzenskräften unterstützten und mir letztendlich alles ermöglichten, sowie an meine Schwester Stefanie Dresler und meinem Großvater Herbert Nitsch.

Inhaltsverzeichnis

	Symbolverzeichnis	V
1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	5
	2.1 Aufgabenstellung	6
3	Theoretische Grundlagen.....	9
	3.1 Hydrolasen	9
	3.1.1 Struktur und katalytischer Mechanismus.....	9
	3.2 Lipasen.....	12
	3.2.1 Definition.....	12
	3.2.2 Klassifizierung bakterieller Lipasen	13
	3.3 Cutinasen	14
	3.4 Polyhydroxyalkanoat (PHA)-Depolymerasen	16
	3.5 Hydrolase aus <i>Thermobifida fusca</i>	19
	3.5.1 Isolation und Produktion.....	19
	3.5.2 Enzymcharakteristika der Hydrolase aus <i>T. fusca</i>	19
	3.6 Rekombinante Produktion der Hydrolase aus <i>T. fusca</i> in <i>E. coli</i>	20
	3.6.1 Herstellung des Expressionsvektors	20
	3.6.2 Prozessstrategien zur Produktion rekombinanter Proteine	21
	3.6.3 Proteinsekretion in <i>E. coli</i>	22
	3.7 Allgemeine Mechanismen des biologischen Abbaus von Polymeren	24
	3.7.1 Biologisch abbaubare Polymere: Definition und Testverfahren.....	24
	3.7.2 Mikrobielle Abbaumechanismen.....	26
	3.7.2.1 Umweltspezifische Einflussfaktoren.....	26
	3.7.2.2 Mikrobielle Einflussfaktoren	27
	3.7.2.3 Polymerspezifische Einflussfaktoren.....	28
4	Material und Methoden.....	31
	4.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	31
	4.2 Nährmedien.....	33
	4.2.1 LB-Medium	33
	4.2.2 Minimalmedium M9	34
	4.2.3 Synthetisches Kulturmedium (HDF-Medium)	35
	4.3 Mikrobiologische Techniken	36
	4.3.1 Stammhaltung.....	36
	4.3.2 Vorkulturen.....	36
	4.3.3 Kultivierung im Schüttelkolben.....	36

4.3.4	Bioreaktorsystem und Kultivierung im Bioreaktor.....	37
4.3.4.1	Bioreaktor	37
4.3.4.2	Anlagenkonfiguration	37
4.3.4.3	Batchkultivierung.....	39
4.3.4.4	Hochzelldichtekultivierung.....	39
4.3.4.5	Berechnung von Prozessparametern	40
4.4	Proteinaufarbeitung.....	42
4.4.1	Zellaufschlussmethoden	42
4.4.1.1	Ultraschall	44
4.4.1.2	Osmotischer Schock.....	42
4.4.1.3	Chemischer Zellaufschluss	43
4.4.2	Hitzebehandlung	44
4.4.3	Chromatographie	44
4.4.3.1	Metall-Chelat-Chromatographie	45
4.4.3.2	Gelfiltration.....	46
4.5	Analytik	46
4.5.1	Biomasse und optische Dichte.....	46
4.5.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	47
4.5.3	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	48
4.5.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	49
4.5.4.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	49
4.5.4.2	Elektroporation von <i>E. coli</i> Zellen.....	49
4.5.5	SDS-Gelelektrophorese	50
4.5.6	Transfer der Proteine vom SDS-Gel.....	53
4.5.7	N-terminale Aminosäuresequenzierung	53
4.5.8	Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten	54
4.5.9	Proteinbestimmung	54
4.6	Polyesteranalytik.....	54
4.6.1	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	54
4.6.2	Differentialkalorimetrie (DSC).....	55
4.6.3	Bestimmung von Partikelgrößen	55
4.6.4	Herstellung von Polyesterfilmen	55
4.6.5	Herstellung von dP(3HB)-Granulasuspensionen.....	56
4.6.6	Herstellung von Polyesternanopartikeln.....	56
4.7	Enzymanalytik	57
4.7.1	Enzyme	57
4.7.2	Substrate	58
4.7.2.1	Polyester.....	58

4.7.2.2	Triglyceride und <i>p</i> -Nitrophenylester	62
4.7.3	Bestimmung der Enzymaktivität	63
4.7.3.1	Enzymaktivitätsmessungen am Spektralphotometer	63
4.7.3.1.1	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat (<i>p</i> NPP)	63
4.7.3.1.2	BTA 40/60 Film	64
4.7.4	Bestimmung der Enzymaktivität am pH-stat Titrator	64
4.7.4.1	Messanordnung	64
4.7.4.2	Berechnung der Abbauraten und Enzymtests	66
4.7.4.2.1	Berechnung der Abbauraten	66
4.7.4.2.2	Enzymtests	67
4.7.5	Bestimmung der Temperaturstabilität	68
4.7.6	Polyesterspaltprodukte	68
4.7.7	Transmissionselektronenmikroskopie	69
4.8	Strukturvorhersage des dreidimensionalen Tfh-Proteinmodells	69
5	Ergebnisse und Diskussion	70
5.1	Produktion und Reinigung der rekombinanten Tfh	70
5.1.1	Batchkultivierungen	70
5.1.1.1	Batchkultivierung im LB-Medium	71
5.1.1.2	Batchkultivierung im synthetischen Kulturmedium	72
5.1.1.3	Zusammenfassung der Batchkultivierungen	75
5.1.1.4	Untersuchung der rTfh Freisetzung in den Kulturüberstand	76
5.1.2	Produktion von rTfh mit Hilfe der Hochzelldeckte kultivierung	79
5.1.3	Reinigung der rTfh	86
5.1.3.1	rTfh geringer Reinheit	86
5.1.3.2	rTfh hoher Reinheit	88
5.1.4	Zusammenfassung der rTfh Produktion in <i>E. coli</i> TG1:pλTfh	90
5.2	Vergleichende Untersuchungen zum Abbaumechanismus an Polyestern	94
5.2.1	Enzymformulierungen	94
5.2.1.1	Die dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 aus <i>Paucimonas lemoignei</i>	97
5.2.2	Allgemeine biochemische Charakterisierung	97
5.2.2.1	Temperaturoptimum und –stabilität	97
5.2.2.2	pH-Optimum	101
5.2.2.3	Substratspektrum und Grenzflächenaktivierung	102
5.2.2.4	Das dreidimensionale Proteinmodell der Hydrolase Tfh	107
5.2.3	Enzymatische Hydrolyse von Polyesterfilmen	110
5.2.3.1	Vergleich der Polyesterabbauraten	112
5.2.3.2	Vergleich der Polyesterspaltprodukte	114
5.2.4	Enzymatische Hydrolyse von PET-Nanopartikeln	118

5.2.5	Enzymatische Hydrolyse von Poly(3-Hydroxybutyrat).....	123
5.2.5.1	Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Enzymaktivität der Phaz5	131
5.2.5.2	Enzymatische Hydrolyse von synthetisch aliphatischen Nanopartikeln.....	135
5.2.6	Enzymatische Hydrolyse von dP(3HB)-Nanopartikeln mit Lipasen.....	137
5.2.7	Zusammenfassende Darstellung der vergleichenden Untersuchungen zum Abbaumechanismus an Polyestern	141
6	Literatur und Internet-Adressen.....	153
6.1	Literaturverzeichnis	153
6.2	Internet-Adressen.....	164
7	Anhang.....	165

Symbolverzeichnis

Abkürzungen

A	Adipinsäure
AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>atomic force microscopy</i>)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
B	1,4-Butandiol
BSA	Bovine serum albumin
BTA	Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure
CHCl ₃	Chloroform
CcL	Lipase aus <i>Candida cylindracea</i>
CMC	kritische Mizellenkonzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
DSC	Differentialkalorimetrie
dP(3HB)	denaturierte Poly(hydroxybutyrat)
dPHA	denaturierte Poly(hydroxyalkanoat)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GPC	Gelpermeationschromatographie
HDF	Hochzelldichtekultivierung (<i>high cell density fermentation</i>)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HFIP	Hexafluoroisopropanol
LB	Luria-Bertani
MeOH	Methanol
milliQ-H ₂ O	bidestilliertes Wasser
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
n.b.	nicht bestimmt
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
nP(3HB)	native Poly(3-hydroxybutyrat)
nPHA	native Poly(hydroxyalkanoat)
PBT	Poly(butylterephthalat)
PCL	Poly(ε-caprolacton)

PET	Poly(ethylterephthalat)
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat
PsL	Lipase aus <i>Pseudomonas species</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP x/y	gesättigter aliphatischer Polyester (<i>saturated polyester</i>) (aus einer Diolkomponente und einer Dicarbonsäurekomponente mit x bzw. y Kohlenstoffatomen)
T	Terephthalsäure
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TfH	Hydrolase aus <i>Thermobifida fusca</i>
rTfH	rekombinante Hydrolase aus <i>Thermobifida fusca</i>
<i>T. fusca</i>	<i>Thermobifida fusca</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)

Formelzeichen

Å	Ångström	—
A	Oberfläche	m ²
a	molarer Kohlenstoffanteil	mol mol ⁻¹
BTM	Biotrockenmasse	g L ⁻¹
c	Konzentration	g L ⁻¹
d / ø	Durchmesser	m
Da	Dalton	—
E _A	Aktivierungsenergie	[kJ mol ⁻¹]
E ₀	Proteinkonzentration	g mL ⁻¹
F	Zufütterungsrate	L h ⁻¹
ΔH _m	Schmelzenthalpie	J g ⁻¹
k ₂	Geschwindigkeitskonstante	cm ³ (min μg) ⁻¹
k _s	Geschwindigkeitskonstante	μmol min ⁻¹
K	Desorptionsgleichgewichtskonstante	μg cm ⁻³
K _A	Adsorptionsgleichgewichtskonstante	cm ³ μg ⁻¹

M	Molekulargewicht	g mol^{-1}
M_n	Zahlenmittel der Molmasse	g mol^{-1}
M_w	Gewichtsmittel der Molmasse	g mol^{-1}
m	Masse	g
n	Molzahl	mol
q_{\max}	maximale Enzymbelegung	$\mu\text{g cm}^{-2}$
Q_{CO_2}	Kohlendioxidbildungsrate	g (L h)^{-1}
Q_{O_2}	Sauerstoffaufnahme	g (L h)^{-1}
r	Abbaurrate	$\mu\text{mol min}^{-1}$
r	Radius	m
rpm	Umdrehungen pro Minute	—
RQ	Respirationsquotient	—
S	Glukosekonzentration	g L^{-1}
t	Zeit	h
t_f	Kultivierungszeit nach Beginn der Fed-Batch Phase	h
T_G	Glastemperatur	$^{\circ}\text{C}$
T_m	Schmelztemperatur	$^{\circ}\text{C}$
X	Biomasse	g L^{-1}
(XV)	Biomasse zu Beginn der Kultivierung	g
$Y_{x/s}$	Biomasse-Ertragskoeffizient	g g^{-1}
\dot{V}_{CO_2}	Kohlendioxidvolumenstrom unter Normalbedingungen	L
\dot{V}_G	Gasgesamtvolumenstrom unter Normalbedingungen	L
\dot{V}_{Luft}	Luftvolumenstrom unter Normalbedingungen	L
\dot{V}_{O_2}	Sauerstoffvolumenstrom unter Normalbedingungen	L
V	Reaktorvolumen	L
V_L	Flüssigkeitsvolumen	L
V_N	Normvolumen	L mol^{-1}
$X_{\text{CO}_2}^e$	CO_2 Molenbruch in der Bioreaktorzuluft	—
$X_{\text{CO}_2}^a$	CO_2 Molenbruch in der Bioreaktorabluft	—
$X_{\text{O}_2}^e$	O_2 Molenbruch in der Bioreaktorzuluft	—
$X_{\text{O}_2}^a$	O_2 Molenbruch in der Bioreaktorabluft	—

griechische Formelzeichen

μ	spezifische Wachstumsrate	h^{-1}
θ	Belegungsgrad der Oberfläche	—
ρ	Dichte	g cm^{-3}
ρ_{EB}	molare Esterdichte im Polyester	$\text{mol}_{\text{EB}} \text{cm}^{-3}$

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine thermophile, polyesterspaltende Hydrolase aus *Thermobifida fusca* (rTfH) in *Escherichia coli* heterolog produziert und im Vergleich zu anderen Hydrolasen charakterisiert.

Durch die Produktion von rTfH in Batch- und Hochzelldichtekultivierungen unter Verwendung eines temperatursensitiven Induktionssystems wurden im Vergleich zum Wildstamm *T. fusca* um mehr als das 100fache höhere Produktivitäten erzielt. Im Falle der Hochzelldichtekultivierung wurde eine Hydrolasekonzentrationen von ca. $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei einer Biomasse von mindestens 50 g L^{-1} und einer Raumzeitausbeute von mindestens $10 \text{ U}_{\text{pNPP}} (\text{Lh})^{-1}$ erreicht.

Die *E. coli* spezifische Signalsequenz OmpA am N-Terminus der TfH-Aminosäuresequenz gewährleistete die Translokation der Hydrolase vom Cytoplasma in das Periplasma. In den Batchkultivierungen wurde nach Induktion die synthetisierte rTfH in den periplasmatischen Raum transportiert, von wo aus unerwartet eine weitere Translokation der Hydrolase in das Kultivierungsmedium beobachtet wurde. In den Hochzelldichtekultivierungen hingegen verblieb die produzierte rTfH größtenteils in gelöster Form im Cytoplasma und nur etwa 35 % der gebildeten rTfH passierte die cytoplasmatische Membran. N-terminale Aminosäuresequenzierungen der rTfH aus dem Kultivierungsmedium ergaben, dass die rTfH offenbar nicht durch Zelllyse freigesetzt wurde, da N-Termina mit vollständiger OmpA-Signalsequenz nicht nachweisbar waren.

Vor dem Hintergrund einer technischen Anwendung der z.B. auch PET hydrolysierenden rTfH, wurde ein kostengünstiges Aufarbeitungsschema entworfen, welches einen stabilen und lagerungsfähigen rTfH-Rohextrakt mit einem rTfH-Gehalt von etwa 5 % (w/w) der Gesamtproteinmenge lieferte. Durch Klonierung eines His₆-Tags an das TfH-Gen war es weiterhin möglich, in einem zweistufigen Aufreinigungsverfahren eine hochreine Hydrolase mit einer spezifischen Aktivität von $445 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ mL}^{-1}$ bei einem Aufreinigungsfaktor und einer Ausbeute von 30 bzw. 57 % zu gewinnen. Diese hochreine Hydrolase stellte die Basis für systematische Studien zum Enzymmechanismus an festen Polymeroberflächen und einer Röntgenstrukturanalyse dar.

Neben der Produktion von rTfH wurden in einem zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit vergleichende Untersuchungen an rTfH, einer kommerziellen Lipase aus *Pseudomonas spec.* (PsL) und einer dP(3HB)-Depolymerase (PhaZ5) aus *Paucimonas lemoignei* zur enzymatisch katalysierten Hydrolyse von wasserlöslichen Estern, ölförmigen Estern und wasserunlöslichen

Polyestern durchgeführt. Eine biochemische Charakterisierung der PsL und rTfH im Vorfeld der vergleichenden Abbauuntersuchungen ergab für die PsL ein Temperaturoptimum von 60 bis 65 °C und ein pH-Optimum von 6,5. Bezüglich der rTfH wurden ein Temperaturoptimum von 55 °C und ein pH-Optimum von 7,0 bestimmt. Ein Unterschied zwischen beiden Enzymen war in der Temperaturstabilität zu finden, die bei 55 °C für rTfH mit einer Halbwertszeit 84 h deutlich höher war als für PsL ($t_{1/2} = 9$ h). In Bezug auf niedermolekulare Triglyceridemulsionen unterschieden sich rTfH und PsL kaum, in der Regel zeigte die PsL geringfügig höhere Aktivitäten.

Der Abbau der festen Polymere mit rTfH und PsL war primär abhängig von der Mobilität der Polyesterketten auf der Polymeroberfläche. Gelpermeationschromatographische Analysen zeigten, dass PsL und rTfH die Polyesterketten im *endo*-Mechanismus spalten. Die Annäherung der Messtemperatur an den Polyesterschmelzpunkt auf weniger als 30 °C führte zu einer signifikanten Erhöhung in der Abbaugeschwindigkeit der Polyester. Ein Vergleich der Polyesterabbauraten untereinander ergab allerdings ein zu den Triglyceridemulsionen entgegengesetztes katalytisches Verhalten. In der Regel waren hier die Abbauraten der rTfH um einen Faktor von 1,5 bis 2 bei aliphatischen Polyestern und um einen Faktor von 2 bis 5 bei aliphatisch-aromatischen Copolyestern höher als bei PsL.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen PsL und rTfH war in der für Lipasen oft beschriebenen Grenzflächenaktivierung der Hydrolasen zu finden, welche für rTfH nicht nachgewiesen werden konnte. rTfH zeigte, im Gegensatz zur PsL, auch gegenüber wasserlöslichen Estern eine signifikante Aktivität, die sich besonders in der von bis zu zwei Größenordnungen höheren Hydrolysegeschwindigkeit von aromatischen Estern dokumentierte. Aufgrund der hohen Aktivität der rTfH gegenüber wasserlöslichen Estern wurden die Polyester auch bis zur Stufe der monomeren Polymerbestandteile hydrolysiert. Durch Generierung eines dreidimensionalen TfH-Proteinmodells, welches ein freizugängliches aktives Zentrum zeigte, konnten die hohen Aktivitäten gegenüber wasserlöslichen Estersubstraten bestätigt werden. Eine „Deckel“-Domäne, die bei lipolytischen Enzymen in der Regel das aktive Zentrum abschirmt und die Hydrolyse von wasserlöslichen Estern verhindert, wurde für rTfH nicht nachgewiesen.

Die dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 zeigte ein differenzierteres Katalyseverhalten. PhaZ5 ist hochspezifisch gegenüber hochschmelzendem dP(3HB), dass in kristalliner Form von rTfH und PsL nicht angegriffen wird. Das Prinzip der Kettenmobilität findet für PhaZ vordergründig keine Anwendung. Die hohen Abbauraten gegenüber dP(3HB) lassen sich

wahrscheinlich auf die substratspezifische Adsorption der Hydrolase zurückführen, die offenbar mit einem Weichmachereffekt zu vergleichen ist und letztendlich zu einer lokalen Erhöhung der Polymerkettenmobilität auf der Oberfläche führt. Die durchgeführten Messungen in Lösungen unterschiedlicher Salzkonzentration liefern Hinweise, dass vermutlich die spezifische Adsorption von Ionen beeinflusst wird und so auch letztendlich Auswirkungen auf die Mobilität der Polymerketten hat. Erstmals konnte allgemein eine Aktivität einer dP(3HB)-Depolymerase gegenüber den synthetischen Polyestern SP 4/6 und PCL nachgewiesen werden. Relativ geringe Aktivitäten der PhaZ5 gegenüber diesen synthetischen Polyestern im Vergleich zu Abbauraten der rTfH und PsL verdeutlichen jedoch, dass das aktive Zentrum der PhaZ5 spezifisch für dP(3HB) ist.

2 Einleitung

Mit der Entwicklung synthetischer Polymere zu Beginn der 40iger Jahre haben Kunststoffe Einzug in nahezu alle Bereiche unseres täglichen Lebens gefunden. In Anbetracht günstiger Herstellungskosten und hervorragender Verarbeitungs- und Materialeigenschaften ist heutzutage ein Großteil der Verpackungsmaterialien aus Kunststoffen gefertigt. Dabei steht die kurze Nutzungsdauer der Verpackungsmaterialien im Widerspruch zu der Langzeitstabilität der Kunststoffe. Als Folge dessen fielen zum Beispiel im Jahr 2003 in Deutschland von etwa 10,6 Mio. t verarbeiteten Kunststoffen insgesamt etwa 4 Mio. t Kunststoffabfälle an, die durch Recycling, Deponierung oder Verbrennung entsorgt werden mussten (Quelle: Umweltdaten Deutschland Online, Version 2004).

Vor dem Hintergrund begrenzten Deponieraumes und der Entstehung toxischer Rückstände bei der Verbrennung der Kunststoffe wird seit Beginn der 80iger Jahre die Entwicklung biologisch-abbaubarer Kunststoffe vorangetrieben. Dies sind Kunststoffe mit einer spezifischen Struktur, die durch natürlich vorkommende Mikroorganismen depolymerisiert und schließlich metabolisiert werden können. Es zeigte sich beispielsweise, dass insbesondere Kunststoffe mit Heteroatomen in der Hauptkette prinzipiell biologisch abbaubar sind [Tokiwa und Suzuki 1977, Kawai 1995]. Weiterhin spielen aber auch übergeordnete physikalische Kunststoffeigenschaften wie Schmelzpunkt, Kristallinität oder Hydrophobizität eine wichtige Rolle bei der Frage, ob ein Kunststoff biologisch abbaubar ist oder nicht [Iwata und Doi 1999, Kaplan et al. 1993, Huang 1985, Marten et al. 2003].

Der enzymatische Mechanismus, der dem biologischen Kunststoffabbau zu Grunde liegt, ist bisher nicht hinreichend geklärt. Kunststoffe sind in der Regel wasserunlöslich und deren polymere Bestandteile sind zu groß, um die Zellmembranen von Mikroorganismen zu passieren. Daher müssen Mikroorganismen Enzyme ausscheiden, die zunächst die Kettenlänge außerhalb der Zellen reduzieren, und die Polymere in wasserlösliche Bestandteile umwandeln, welche dann vom Organismus aufgenommen und metabolisiert werden können. Enzyme können aufgrund ihrer Größe häufig nicht in den Kunststoff eindringen. Deshalb stellt der Bioabbau in der Regel einen enzymatischen Grenzflächenprozess dar, und das Material wird nach und nach von der Oberfläche abgetragen (Oberflächenerosion).

In der Natur sind einige enzymatische Oberflächenprozesse bekannt. Als Beispiele ist hier der Abbau der Polysaccharide Cellulose und Chitin durch Cellulasen bzw. Chitinasen sowie der Abbau des bakteriellen Speicherpolymers Poly(3-hydroxybutyrat) durch Poly(3-hydroxybutyrat)-Depolymerasen zu nennen [Schlegel 1992, Sudesh et al. 2000, Warren 1996,

Lynd et al. 2002]. Die Enzyme, die diese polymeren Substanzen extrazellulär depolymerisieren, gehören alle zur Klasse der Hydrolasen. Weiterhin sind in diesem Zusammenhang noch Peroxidasen zu erwähnen, die am Bioabbau von Lignin beteiligt sind [Schlegel 1992]. Hier greifen die Enzyme mit Wasserstoffperoxid die Polymerkette an und führen eine oxidative Spaltung herbei.

Neben natürlichen „Kunststoffen“ aus nachwachsenden Rohstoffen (Cellulose, Stärke) stellen insbesondere synthetische Polyester innerhalb der biologisch abbaubaren Kunststoffe eine wichtige Gruppe dar und wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. W.-D. Deckwer eingehend untersucht. Neben der Synthese neuer biologisch abbaubarer Kunststoffe standen Untersuchungen zu polymerspezifischen Faktoren, die einen biologischen Abbau begünstigen, im Vordergrund. So konnte beispielsweise ein allgemeiner Zusammenhang zwischen der Bioabbaubarkeit von Polyestern unterschiedlicher Struktur mit der Polyesterschmelztemperatur hergestellt werden [Marten et al. 2003, 2005]. Diese Beobachtungen wurden auf die Kettenmobilität an der Oberfläche der Polyester zurückgeführt, die sich bei der Annäherung der Abbautemperatur an den Polyesterschmelzpunkt signifikant erhöht. Durch die gesteigerte Mobilität der Polymerketten in den kristallinen Domänen lösen sich die zu spaltenden Estergruppen zunehmend temporär aus dem Polymerkristall und passen sich in das aktive Zentrum des spaltenden Enzyms ein.

2.1 Aufgabenstellung

Es hat sich gezeigt, dass für den biologischen Abbau von Polyestern in der Regel extrazelluläre Hydrolasen und hier insbesondere Lipasen eine Rolle spielen. Für systematische Untersuchungen zum Bioabbau von Polyestern werden aufgrund ihres breiten Substratspektrums dann auch häufig Lipasen verwendet. Lipasen gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen und sind durch ihre hohe Enzymaktivität gegenüber wasserunlöslichen und langkettigen Triacylglyceriden gekennzeichnet [Ferrato et al. 1997]. Trotz der umfangreichen in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Polyestern durch Lipasen ist der genaue Mechanismus der enzymatischen Oberflächenreaktion bisher noch nicht vollständig verstanden. In diesem Zusammenhang ist die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit zu sehen, in der durch die Produktion einer aufgereinigten und charakterisierten polyesterabbauenden Hydrolase sowie durch systematisch vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen anderen Hydrolasen neue Erkenntnisse zum Mechanismus der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von Estergruppen an wasserunlöslichen

Kunststoffoberflächen gewonnen werden sollten.

In Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. W.-D. Deckwer wurde unter anderem eine Hydrolase aus dem Actinomyceten *Thermobifida fusca* isoliert, welche ein hohes Abbaupotential sowohl gegenüber aliphatischen als auch gegenüber aliphatisch-aromatischen Copolyestern aufweist [Kleeberg et al. 2005]. Des Weiteren wurde durch Sequenzierung der für die TfH kodierende DNA-Bereich identifiziert. [Deckwer et al. 2001]. Dieser wurde anschließend in einen Expressionsvektor kloniert und in *E. coli* zur Expression gebracht.

Das Ziel dieser Arbeit war zunächst die Entwicklung eines Prozesses zur Produktion dieser Hydrolase mit Hilfe eines rekombinanten *E. coli* Stammes. Dabei sollten verschiedene Prozessstrategien mit der Zielrichtung auf eine kommerzielle Produktion etabliert und gegenübergestellt werden. Weiterhin sollte das Enzym in möglichst hochreiner Form isoliert werden.

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der vergleichenden Untersuchung der Hydrolase aus *T. fusca* mit anderen (kommerziellen) Lipasen sowie einer dP(3HB)-Depolymerase hinsichtlich ihrer abbauenden Eigenschaften gegenüber Polyestern mit verschiedenen definierten Strukturen. Unter Einbeziehung spezifischer Strukturmerkmale der eingesetzten Hydrolasen sollten so detaillierte Informationen zum Mechanismus der heterogenen Katalyse von Polyestern an hydrophoben Kunststoffoberflächen gewonnen werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Hydrolasen

3.1.1 Struktur und katalytischer Mechanismus

Die α/β -Hydrolasen-Faltung ist das allgemeingültige Faltungsmuster, welches allen Serin-Hydrolasen, wie beispielsweise Acetylcholinesterasen, Dienlacton-Hydrolasen, Lipasen, Haloalkan-Dehalogenasen und Carboxypeptidasen, zu Grunde liegt [Ollis et al. 1992, Sussman et al. 1991, Pathak und Ollis 1990, Schrag et al. 1991, Liao und Remington 1990, Franken et al. 1991]. Das typische α/β -Hydrolasen-Faltungsmuster besteht aus einem parallelen β -Faltblatt mit meist acht Strängen, wobei der zweite Strang antiparallel angeordnet ist (Abb. 3-1). Das Faltblatt weist eine linksgängige Krümmung auf, wobei der erste und letzte Strang einen Winkel von 90° zueinander bilden. Auf beiden Seiten des Faltblattes sind α -Helices angeordnet. Einige α/β -Hydrolasen weichen von diesem allgemeingültigen Muster ab und weisen Insertionen oder auch Deletionen sowohl im Faltblatt als auch bei den α -Helices auf [Nardini und Dijkstra 1999, Holmquist 2000]. Als ein Beispiel für eine Insertion wäre hier die „Deckel“-Domäne bei Lipasen zu nennen, die sich in der Regel aus ein bis zwei α -Helices zusammensetzt [Jaeger et al. 1994].

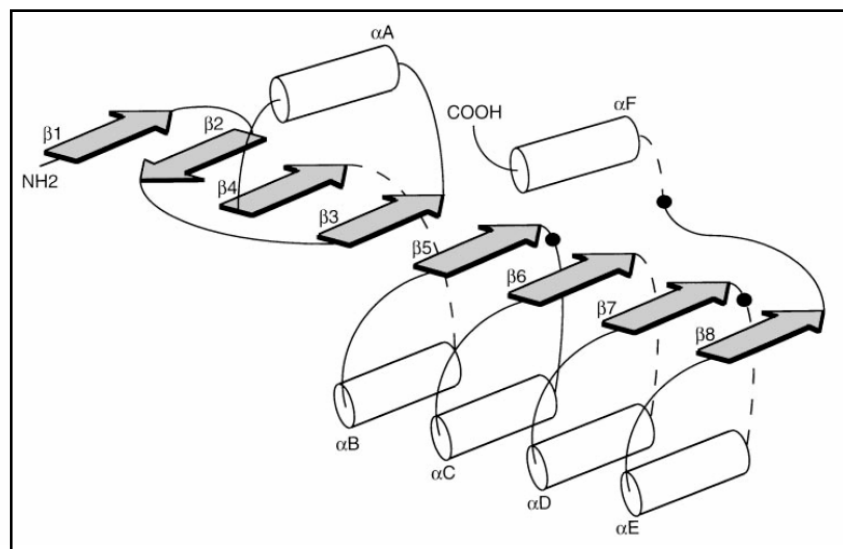


Abb. 3-1: Topologisches Diagramm des α/β -Hydrolasen-Faltungsmusters mit den zylindrischen α -Helices und den durch graue Pfeile dargestellten β -Strängen [Ollis et al. 1992]. Die gestrichelten Linien stellen Bereiche dar, in denen Insertionen auftreten können. Die katalytische Triade Nukleophil-Säure-His ist durch schwarze Punkte markiert.

Allen α/β -Hydrolasen ist im Allgemeinen die katalytische Triade bestehend aus dem Nukleophil (Ser, Cys, Asp), der Säuregruppe (Asp, Glu) und dem Histidin gemein. Je nach Enzymgruppe sind die Aminosäuren der katalytischen Triade verschieden angeordnet. Das Nukleophil befindet sich in einem hoch konservierten Pentapeptid Sm-X-Nu-X-Sm (Sm = kleine Aminosäure, X = unbekannte Aminosäure, Nu = Nukleophil) innerhalb eines scharfen „ γ -turns“ zwischen dem β 5-Strang und der darauffolgenden α -Helix. Dieses Strang-Turn-Helix Motiv bildet den so genannten „nucleophile elbow“, der aufgrund seines energetisch ungünstigen Zustandes unter hoher Belastung an der Spitze steht und somit das Nukleophil stärker exponiert [Jaeger et al. 1999]. Die katalytische Säure liegt meistens hinter dem β 7-Strang und das Histidin hinter dem β 8-Strang.

Ein weiteres Strukturmerkmal der α/β -Hydrolasen ist das Oxyanionenloch. Dies wird meistens während der enzymatischen Katalyse ausgebildet und stabilisiert mittels Wasserstoffbrücken das tetraedische Zwischenprodukt. Das Oxyanionenloch setzt sich zumeist aus zwei Aminogruppen des Peptidgerüsts zusammen, wobei eine Aminogruppe aus der Aminosäure direkt hinter dem Nukleophil stammt.

Der Katalysemechanismus der Hydrolasen, hier am Beispiel der Lipasen [Jaeger et al. 1999, Voet und Voet 1994] erklärt, ist in zwei Abschnitte zu unterteilen (Abb. 3-2). Zu Beginn der enzymatischen Katalyse greift die Hydroxylgruppe des nukleophilen Serins die Carbonylgruppe der Esterbindung an. Dabei bildet sich ein tetraedrisches Zwischenprodukt aus, dessen negative Ladung durch das Oxyanionenloch stabilisiert wird. Das Proton der Serin-Hydroxylgruppe wird unter Ausbildung des Imidazoliumringes auf das Histidin übertragen. Über eine Wasserstoffbrücke mit der katalytischen Säure wird der Imidazoliumring zusätzlich stabilisiert. Durch Deprotonierung des Histidins und Anlagerung des Protons auf den Sauerstoff der Esterbindung kommt es zum Zerfall des tetraedrischen Zwischenproduktes in Acylrest und Alkohol. Die entstandene Acylgruppe ist über eine Esterbindung kovalent mit Serin (Acyl-Enzym-Komplex) verknüpft. Der Alkohol diffundiert aus dem katalytischen Zentrum hinaus.

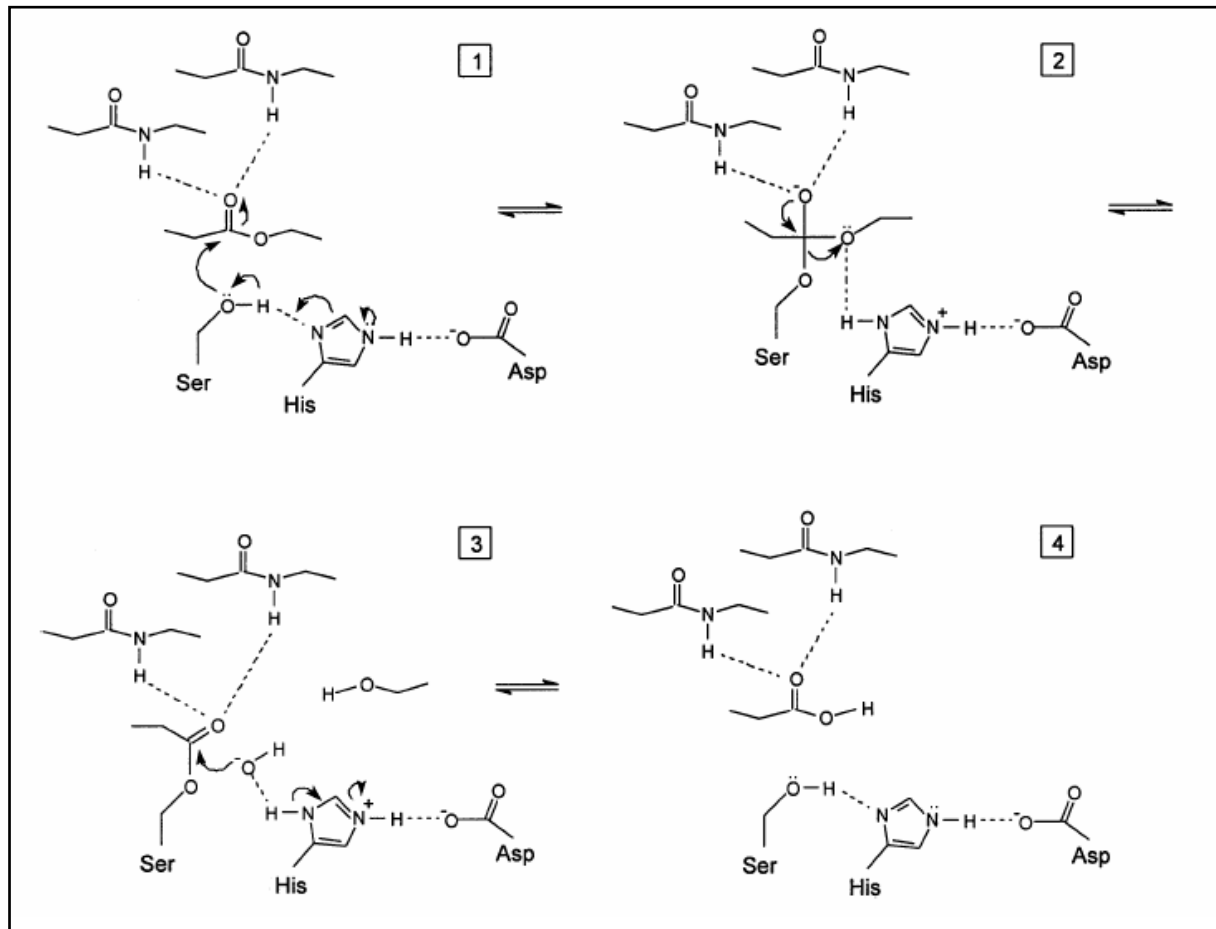


Abb. 3-2: Der katalytische Mechanismus von Lipasen. 1. Bindung der Estergruppe im katalytischen Zentrum und nukleophiler Angriff durch die Hydroxylgruppe des Ser an der Carbonylgruppe. Ausbildung des Imidazoliumringes im His. 2. Ausbildung des tetraedrischen Zwischenproduktes. Stabilisierung der negativen Ladung durch das Oxyanionenloch. Übertragung des Protons vom His auf eine Sauerstoffgruppe der Esterbindung. Freisetzung der Alkoholgruppe. 3. Bildung des Acyl-Enzym-Komplexes. Deprotonierung des Wassermoleküls durch His zum Hydroxylat, das die Carbonylgruppe nukleophil angreift. 4. Freisetzung der Säure und Regeneration der katalytischen Triade. Abbildung wurde aus Jaeger et al. [1999] entnommen.

Der zweite Katalyseschritt umfasst die Decarboxylierung der Acylgruppe vom Serinrest durch ein Wassermolekül und die anschließende Regeneration der katalytischen Triade. Das Proton des Wassermoleküls wird hierbei auf den Imidazoliumring übertragen und die dabei entstehende Hydroxylgruppe greift unter Ausbildung des tetraedrischen Zwischenprodukts den Acyl-Enzym-Komplex nukleophil an. Analog zum ersten Katalyseschritt wird das Proton des Imidazoliumringes auf den Ser-Rest übertragen, welches die Freisetzung der Fettsäure und die Regeneration der katalytischen Triade zur Folge hat.

3.2 Lipasen

3.2.1 Definition

Lipasen (EC Nummer 3.1.1.3) gehören zur Gruppe der lipolytischen Enzyme und katalysieren die Hydrolyse von Esterbindungen in Triacylglyceriden unter Bildung von Fettsäuren und Glycerin. Lipasen wurden erstmals 1903 als von Bakterien sekretierte Enzyme erwähnt [Eijkmann 1901]. Sowohl Holwerda et al. [1936] als auch Schönheyder und Volquartz [1945] beobachteten eine Erhöhung der Enzymaktivität gegenüber wasserunlöslichen Substraten im Vergleich zu den gleichen Substraten in gelöstem Zustand. Im Jahre 1958 erfolgte eine erste Definition zur Kinetik von Lipasen und Esterasen (EC 3.1.1.1) [Sarda und Desnuelle 1958]. Gemäß dieser Definition wurden Lipasen als Enzyme charakterisiert, die beim Überschreiten der kritischen Micellenkonzentration des Substrates einen sprunghaften Anstieg ihrer lipolytischen Aktivität zeigen. Esterasen hingegen folgen der Michaelis-Menten-Kinetik und katalysieren die Hydrolyse kurzkettiger Carboxylester [Desnuelle et al. 1960].

Durch die Strukturaufklärung der Lipase aus *Rhizomucor miehei* wurde das Phänomen der Grenzflächenaktivierung einer deckelähnlichen Oberflächenstruktur zugeordnet [Brady et al. 1990, Brzozowski et al. 1991, Derewenda et al. 1992]. Diese schirmt in einer wässrigen Umgebung das aktive Zentrum ab und verhindert somit die enzymatische Katalyse von in Wasser gelösten Estersubstraten. Erst durch Adsorption an einer Substrat-Wasser Grenzfläche unterzieht sich die „Deckel“-Domäne einer konformativen Veränderung und gibt somit das aktive Zentrum frei. Des Weiteren wird das Oxyanionenloch zum aktiven Zentrum hin ausgerichtet. Weitere 3D-Strukturen von Lipasen aus *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa* und *Rhizopus delemar* stützen das Modell der Grenzflächenaktivierung [Grochulski et al. 1993, Cygler und Schrag 1999, Mañcheno et al. 2003, Ghosh et al. 1995, Derewenda et al. 1994].

In den letzten Jahren wurden allerdings auch Lipasen entdeckt, die von diesem Modell abweichen. So zeigen Lipasen aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas glumae* sowie die Pankreas-Lipase aus *Myocastor coypus* keine Grenzflächenaktivierung, obwohl eine „Deckel“-Domäne vorhanden ist [Nardini et al. 2000, Carriere et al. 1994, Noble et al. 1993, Jaeger et al. 1993]. Für die Lipase A aus *Bacillus subtilis*, die Lipase B aus *Candida antartica* und die Lipase aus *Streptomyces exfoliatus* wurde durch Aufklärung der Kristallstruktur keine „Deckel“-Domäne nachgewiesen und zeigen daher auch keine Grenzflächenaktivierung [Wei et al. 1998, Longhi et al. 1997a, Martinez et al. 1992, Eggert et al. 2002, Hjorth et al. 1993, van Pouderoyen et al. 2001, Uppenberg et al. 1994]. Die Lipase von *Staphylococcus hyicus*

zeigt beispielsweise nur in Gegenwart bestimmter Substrate eine Grenzflächenaktivierung [van Oort et al. 1989].

Folglich stellt das Vorhandensein einer „Deckel“-Domäne kein ausreichendes Kriterium zur Definition einer Lipase dar. Daher wurden andere Definitionen zur Abtrennung der Lipasen von Esterasen vorgeschlagen, die sich auf die Verteilung der hydrophoben Aminosäuren um das aktive Zentrum oder auf das kinetische Verhalten gegenüber Emulsionen aus Vinylestern und Triacylglyceriden berufen [Chahinian et al. 2002, Fojan et al. 2000, Neves Petersen et al. 2001]. In letzter Zeit hat sich die Definition durchgesetzt, dass Lipasen Carboxylesterasen sind, die die Fähigkeit besitzen, wasserunlösliche und langkettige Triacylglyceride ($C \geq 10$) zu hydrolysieren [Verger 1997, Ferrato et al. 1997]. Triacylglyceride mit einer C-Kettenlänge von weniger als zehn C-Atomen hingegen werden von Carboxylesterasen katalysiert. Jedoch sollte hervorgehoben werden, dass auch Lipasen in der Lage sind, kurzkettige Triacylglyceride zu spalten [Jaeger et al. 1999].

3.2.2 Klassifizierung bakterieller Lipasen

1999 wurde erstmal eine Klassifizierung bakterieller lipolytischer Enzyme von Arpigny und Jaeger [1999] veröffentlicht, welche die Vielfalt innerhalb der Lipasen betont. Auf Grundlage struktureller und katalytischer Merkmale erfolgt eine Unterteilung in acht Familien. Familie I umfasst die „echten“ Lipasen und ist aufgrund ihrer Diversität in sechs Unterfamilien unterteilt. In den Unterfamilien I.1 bis I.3 sind hauptsächlich Lipasen der Gattung *Pseudomonas* und *Burkholderia* zu finden, die sich hinsichtlich des Molekulargewichts, des Sekretionsweges und struktureller Merkmale, wie zum Beispiel die Anzahl der Cystinbrücken und Ca^{2+} -Bindungsstellen, unterscheiden lassen. In den Unterfamilien I.4 und I.5 sind Lipasen Gram positiver Bakterien zusammengefasst, die anstatt des ersten Glycins ein Alanin im konservierten Pentapeptid (Ala-Xaa-Ser-Xaa-Gly) aufweisen.

Lipolytische Enzyme mit dem konservierten Gly-Asp-Ser-(Leu) Motiv werden der Familie II zugeordnet. In diese Gruppe wird ebenfalls die *Streptomyces scabies* Esterase eingeordnet, die anstatt der katalytischen Triade eine katalytische Dyade besitzt. Familie III setzt sich aus extrazellulären Lipasen der Gattung *Streptomyces* mit dem typischen α/β -Hydrolasen-Faltungsmuster und der katalytischen Triade zusammen. Lipolytische Enzyme, welche eine hohe Sequenzhomologie zu hormonsensitiven Lipasen aus Säugern und das Pentapeptid Gly-Asp-Ser-Ala-Gly aufweisen, werden der Familie IV zugeordnet. Familie V umfasst lipolytische Enzyme, die eine hohe Sequenzidentität zu nicht lipolytischen Enzymen besitzen.

In den drei verbliebenen Familien VI bis VIII sind Esterasen zusammengefasst, die sich im Molekulargewicht und bezüglich der Substratspezifität unterscheiden. Esterasen, die eine hohe Sequenzhomologie zu der Klasse C der β -Lactamasen haben, finden sich in der Familie VIII.

In einer weiteren Datenbank der „Lipase Engineering Database“ (LED), sind neben bakteriellen lipolytischen Enzymen weitere mikrobielle Hydrolasen aufgelistet [Pleiss et al. 2000, Fischer und Pleiss 2003]. Derzeit sind dort die Sequenzen von 3774 Lipasen und 516 Kristallstrukturen zusammengefasst (Stand: Okt. 2006, LED, Release 2.3) [Pleiss et al. 2000]. Hier erfolgt eine erste Einordnung der Hydrolasen in die zwei Klassen **GX** und **GGGX**. Beide Gruppen werden dann noch zusätzlich in Super- und Homologiefamilien unterteilt. Die Klassifizierung der Hydrolasen ist von der Position der Aminosäure, die zusammen mit einer weiteren Aminosäure direkt hinter dem Nukleophil das Oxyanionenloch ausbildet, in der Aminosäuresequenz abhängig. Zum **GX**-Typus werden Hydrolasen gezählt, bei denen im Upstream-Bereich des Nukleophils die Oxyanionenloch-Aminosäure **X** C-terminal neben einem konservierten Glycin-Rest lokalisiert ist. Beim **GGGX**-Typus ist die Oxyanionenloch-Aminosäure **Gly** und in einer konservierten Region aus drei Glycinresten und einem hydrophoben Aminosäurerest **X** eingebettet.

3.3 Cutinasen

Cutinasen (E.C. 3.1.1.) sind extrazelluläre Hydrolasen, die Esterbindungen des Cutin, ein Polymer der Cuticula auf pflanzlichen Epidermiszellen, hydrolysieren [Kolattukudy 1984]. Cutinasen werden hauptsächlich von phytopathogenen Pilzen und Pollen produziert. Neben der vornehmlichen Hydrolyse langkettiger, primärer Carboxylester (C_{16} und C_{18}) katalysieren Cutinasen eine Reihe weiterer Reaktionen, wie die Hydrolyse von kurz- und langkettigen Triacylglyceridemulsionen und die Hydrolyse synthetischer Ester [Murphy et al. 1996, de Geus et al. 1989]. Aufgrund des breiten Substratspektrums, welches auch die Hydrolyse löslicher Esterverbindungen umfasst, werden die Cutinasen entweder als Bindeglied zwischen Esterasen und Lipasen oder als eine Untergruppe der Lipasen [Mannesse et al. 1995, Pleiss et al. 1998, Cygler und Schrag 1997] gesehen. Cutinasen sind zudem im Gegensatz zu den „typischen“ Lipasen (z.B. *Rhizomucor miehei*) nicht grenzflächenaktiviert, d. h. an der Substrat-Wasser-Grenzfläche wird keine sprunghafte Erhöhung der Enzymaktivität beobachtet.

Dieses katalytische Verhalten spiegelt sich auch in der dreidimensionalen Röntgenstruktur der Cutinase aus *Fusarium solani* f. *pisi* wieder (Abb. 3-3) [Martinez et al. 1992, Longhi et al. 1997b, Longhi et al. 1997a]. Das bisher kleinste Enzym aus der Familie der Esterasen und Lipasen besteht aus 197 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 22 kDa. Das α/β -Hydrolasenfaltungsmuster ist um 3 β -Stränge im Vergleich zum allgemeingültigen α/β -Hydrolasenfaltungsmuster verkürzt (Abb. 3-1). Des Weiteren ist die katalytische Triade (Ser, Asp und His) homolog zu derjenigen anderer Lipasen/Esterasen, und das katalytische Serin ist im konservierten Pentapeptid Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly eingebettet.

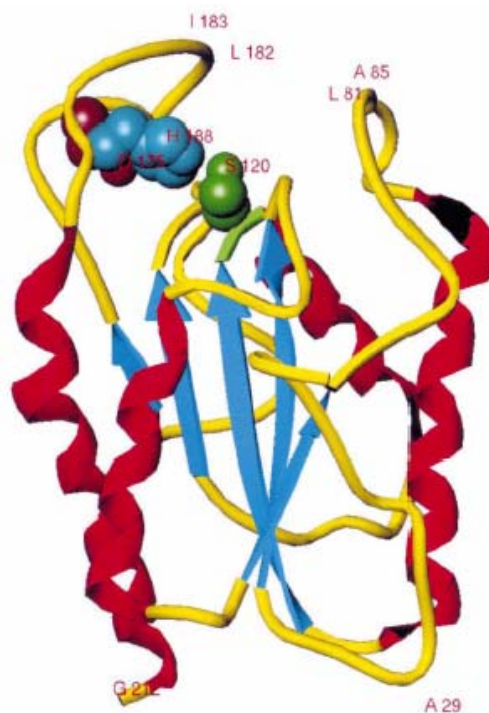


Abb. 3-3: Dreidimensionale Röntgenstruktur der *Fusarium solani* f. *pisi* Cutinase. Die α -Helices und das β -Faltblatt und die Loops sind rot, blau bzw. gelb unterlegt. Die katalytische Triade mit Ser (grün), Asp (rot) und His (blau) sind als Sphären dargestellt. Die Abbildung ist aus Longhi und Cambillau [1999] entnommen.

Als besonderes Strukturmerkmal weisen die Cutinasen ein katalytisches Zentrum auf, welches nicht von einer „Deckel“-Domäne bedeckt ist. Die fehlende Deckeldomäne wird im Allgemeinen auch für die nicht vorhandene Grenzflächenaktivierung herangezogen. Zudem zeigen die Röntgenstrukturen der Cutinase, dass Ser42 und Gln121, welche das Oxyanionenloch bilden, bereits in der richtigen Ausrichtung zum aktiven Zentrum stehen. (Abb. 3-2, Schritt 2) [Martinez et al. 1994]. Allerdings weisen aktuelle Untersuchungen zur Dynamik des Proteingerüsts mittels Kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR)

darauf hin, dass sowohl die Substratbindetasche als auch das Oxyanionenloch auf mobilen Segmenten liegen und einer zu Lipasen vergleichbaren konformativen Veränderung unterliegen [Egmond und de Vlieg 2000]. Obwohl hier Konformationsänderungen in einem viel kleineren Massstab stattfinden, ist der zeitliche Rahmen, der für diese Konformationsänderungen benötigt wird, vergleichbar mit der Geschwindigkeit der katalytischen Reaktion. Es wird daher vermutet, dass die Konformationsänderung, die nach Bindung des Substrates erfolgt, höchstwahrscheinlich geschwindigkeitbestimmend in der Hydrolyse der Estergruppen ist [Prompers et al. 1999].

3.4 Polyhydroxyalkanoat (PHA)-Depolymerasen

Polyhydroxyalkanoat-Depolymerasen (PHA) gehören zu den Carboxylesterasen (EC 3.1.1.75 und EC 3.1.1.76) und weisen ausgeprägte Substratspezifitäten auf, je nachdem ob es sich um intrazelluläres PHA (sogenanntes natives PHA mit amorphen Partikeln im Nanometermaßstab; nPHA-Depolymerasen) oder extrazelluläres PHA (denaturiertes PHA teilkristalliner Struktur, dPHA-Depolymerasen) handelt. Zusätzlich werden PHA-Depolymerasen oft bezüglich ihrer Kettenlängenspezifität in PHA_{SCL}-Depolymerasen (3 bis 5 Kohlenstoffatome = SCL) und PHA_{MCL}-Depolymerasen (6 und mehr Kohlenstoffatome = MCL) differenziert [Jendrossek und Handrick 2002]. Die meisten bisher isolierten PHA-Depolymerasen sind in die Gruppe der dPHA_{SCL}-Depolymerasen einzuteilen, die zumeist eine hohe Substratspezifität gegenüber dP(3HB) zeigen.

Alignment-Studien verschiedener bakterieller dP(3HB)-Depolymerasen ergaben eine Domänenstruktur, die sich in eine katalytische Domäne, eine Linkerdomäne und eine Substratbindedomäne (SBD) unterteilt (Abb. 3-4). Die katalytische Domäne bestehend aus der für Serin-Hydrolasen typischen katalytischen Triade (Ser, Asp, His) und dem konservierten Pentapeptid Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly (Xaa = unbekannte Aminosäure) ist am N-Terminus der Aminosäuresequenz lokalisiert. Die Linkerdomäne verbindet die katalytische Domäne mit der Substratbindedomäne und ist flexibel angelegt. Eine erste Röntgenstrukturanalyse einer dP(3HB)-Depolymerase aus *Penicillium funiculosum* zeigt, dass diese das α/β -Hydrolasenfaltungsmuster aufweist [Hisano et al. 2006]. Allerdings ist im Gegensatz zum allgemeingültigem α/β -Hydrolasenfaltungsmuster (Abb. 3-1) das Faltungsmuster der dP(3HB)-Depolymerase aus *Penicillium funiculosum* permutiert, und die β -Stränge $\beta 7$ bis $\beta 12$ sind den β -Strängen $\beta 1$ bis $\beta 6$ vorgelagert. Analog dazu verhält sich die Anordnung der α -Helices im Faltungsmuster, wobei hier die Helices $\alpha 4$ bis $\alpha 9$ vor den anderen liegen.

Die Domänenstruktur wurde in gezielten Versuchen (z.B. gerichtete Mutagenese) eingehender untersucht. So führte beispielsweise die Deletion der C-terminal gelegenen SBD der dP(3HB)-Depolymerase PhaZ4 aus *Paucimonas lemoignei* zu einem Verlust der Adsorptionsfähigkeit an dP(3HB)-Filmen, wohingegen die katalytische Aktivität gegenüber löslichen Estern erhalten blieb [Behrends et al. 1996]. Auch die beschriebene erfolgreiche Adsorption eines GST-SBD Fusionsproteins an dP(3HB)-Granula unterstützen die Modellvorstellungen zur dP(3HB)-Depolymerasendomänenstruktur [Kasuya et al. 1999].

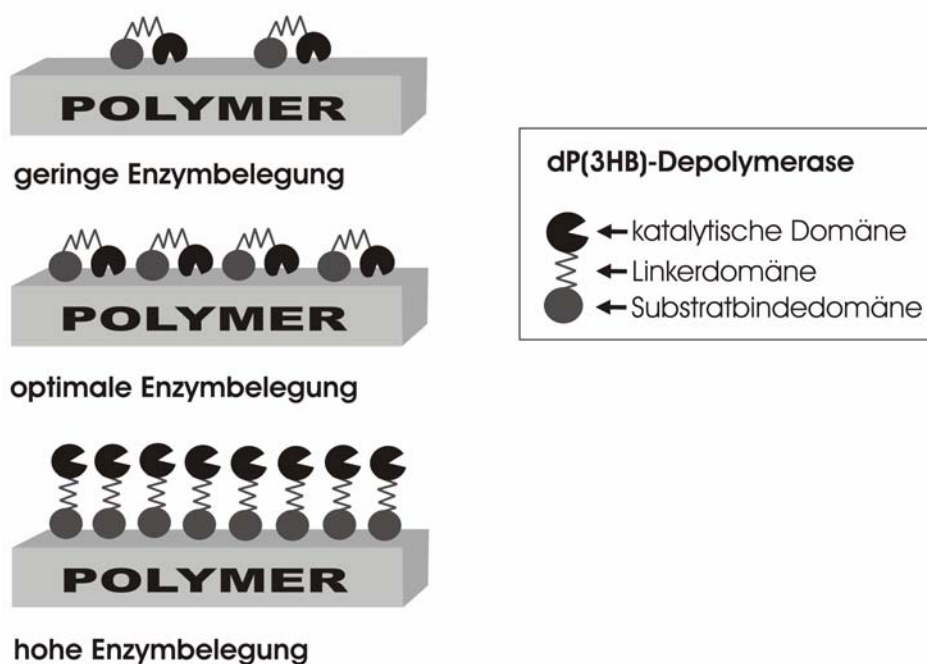


Abb. 3-4: Schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse von dP(3HB)-Filmen mit dP(3HB)-Depolymerasen. Abbildung nach Mukai et al. [1993b] modifiziert.

Als eine Folge des modularen Aufbaus wird bei dP(3HB)-Depolymerasen bei zunehmenden Enzymkonzentrationen eine Inhibition, welche in Abb. 3-4 schematisch dargestellt ist, beobachtet. Eine optimale enzymatische Hydrolyse der Estergruppen auf der Polymeroberfläche wird deutlich unterhalb der maximalen Enzymbelegung erreicht. Bei hoher Enzymbelegung wird die Flexibilität der Linkerdomäne so eingeschränkt, dass das aktive Zentrum nicht mehr an die Polymeroberfläche reicht. Als Folge dessen wird die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes verhindert [Kasuya et al. 1996, Mukai et al. 1993b, Timmins et al. 1997].

Aktuelle Veröffentlichungen weisen daraufhin hin, dass die SBD neben der Adsorption auf der Polymeroberfläche die Aggregationseigenschaften der Polymerketten untereinander beeinflusst [Murase et al. 2002, Kikkawa et al. 2004]. Die Adsorption der SBD an die Polymeroberfläche erfolgt vermutlich sowohl über Wasserstoffbrückenbindungen als auch über hydrophobe Wechselwirkungen [Yamashita et al. 2003, Fujita et al. 2005]. Hiraishi et al. [2006] konnten mittels ungerichteter Mutagenese an der SBD der dP(3HB)-Depolymerase aus *Ralstonia pickettii* T1 vier Aminosäuren (Ser, Tyr, Val, Leu) identifizieren, die in den Adsorptionsvorgang eingebunden sind. Dabei stehen die hydrophilen Reste der Aminosäuren mit den Estergruppen im dP(3HB) (Wasserstoffbrückenbindung) und die hydrophoben Reste mit den Methylgruppen im Polymer (hydrophobe Wechselwirkung) in Interaktion. Rasterkraftmikroskopaufnahmen von dP(3HB)-Oberflächen zeigten nach der Adsorption von dP(3HB)-Depolymerasen Ausbuchtungen auf der Polymeroberfläche, was wahrscheinlich auf starke Bindungskräfte zwischen der SBD und der Polymeroberfläche schließen lässt [Kikkawa et al. 2004]. Aufgrund der besonderen Eigenschaften der SBD wird für die dP(3HB)-Depolymerasen folgender enzymatischer Mechanismus angenommen: Adsorption auf der Polymeroberfläche, Veränderung der Polymerstruktur hervorgerufen durch spezifische Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten und Polymerkette sowie enzymatische Hydrolyse der Estergruppe.

Aufgrund des hohen Schmelzpunktes von dP(3HB) ($T_m=180\text{ °C}$) wird dieses Polymer üblicherweise nicht von anderen Hydrolasen (z.B. Lipasen) hydrolysiert. Marten et al. [2005] zeigte mit Hilfe der Modell-Lipase PsL aus *Pseudomonas spec.*, dass ab einer Temperaturdifferenz ΔT_{mt} (ΔT_{mt} gibt die Differenz zwischen dem Polyesterschmelzpunkt T_m und der Messtemperatur T_{mess} an) größer als 30 °C die Abbaurate gegenüber teilkristallinen Polyestern signifikant abnimmt (und Kap. 3.7.2.3). Im Gegensatz dazu wird bei den dP(3HB)-Depolymerasen trotz einer sehr hohen Temperaturdifferenz ΔT_{mt} von 143 °C ($T_m=180\text{ °C}$; $T_{mess}=37\text{ °C}$) noch ein hoher Abbau des dP(3HB)s nachgewiesen [Jendrosseck und Handrick 2002]. Daher nehmen die dP(3HB)-Depolymerasen innerhalb der Gruppe der polyesterspaltenden Enzyme eine gesonderte Stellung ein.

3.5 Hydrolase aus *Thermobifida fusca*

3.5.1 Isolation und Produktion

In Screeningversuchen mit Kompostproben und BTA-Copolyestern (Copolyester aus 1,4-Butandiol, Adipinsäure und Terephthalsäure) wurden thermophile Actinomyceten isoliert, die ein hohes hydrolytisches Potential gegenüber BTA-Copolyestern aufweisen [Kleeberg 1999, Kleeberg et al. 1998]. Aus diesen Screeningversuchen konnte ein Stamm der Art *Thermobifida fusca* identifiziert werden, der besonders gute Abbaueigenschaften gegenüber den BTA-Copolyestern zeigte.

Über verschiedene Kultivierungsstrategien (Schüttelkolben, 10 L und 100 L Batchkultivierung im Bioreaktor) wurde durch Zugabe von BTA-Copolyestern als Induktor eine Hydrolase ins Kultivierungsmedium exkretiert und erfolgreich aus dem Medium aufgereinigt [Gouda et al. 2002, Kleeberg et al. 2005]. Allerdings hat die Produktion der Hydrolase mit dem Wildstamm *T. fusca* besonders im großtechnischen Maßstab Nachteile, wofür mehrere Ursachen verantwortlich sind [Gouda et al. 2002]. Die Induktion der Hydrolase erfolgt, wie bereits erwähnt, durch die Zugabe von Polyestern, was im großtechnischen Maßstab einen wesentlichen Kostenfaktor darstellt. Hinzu kommen eine Kultivierungstemperatur von 55 °C und die lange Induktionszeit von 48 h, mit der letztendlich relativ geringe TfH-Ausbeuten ($1,5 \text{ U}_{\text{PCL-Film}} \text{ mL}^{-1}$) erzielt werden. Unerwünschte Nebeneffekte wie beispielsweise die Adsorption der Hydrolase an den Induktor zeigen weitere Nachteile der Kultivierung mit dem Wildstamm auf.

3.5.2 Enzymcharakteristika der Hydrolase aus *T. fusca*

Die *Thermobifida fusca* Hydrolase (TfH) ist ein thermophiles Enzym mit einem Temperaturoptimum von 65 °C und einem pH-Optimum von pH 6-7 [Kleeberg et al. 2005]. Neben BTA-Copolyestern hydrolysiert TfH auch aliphatische Polyester und emulgierte Triglyceride. Gegenüber dP(3HB)-Filmen wurde unter den gegebenen Reaktionsbedingungen keine hydrolytische Aktivität nachgewiesen. Allerdings konnte ein enzymatischer Angriff von dP(3HB) durch *T. fusca* beobachtet werden, was vermuten lässt, dass *T. fusca* neben der TfH eine weitere Hydrolase mit spezifischer Aktivität gegenüber dP(3HB) exprimiert [Kleeberg 1999].

Eine katalytische Besonderheit der TfH besteht darin, dass für sie sowohl Lipase- als auch Esteraseaktivität nachgewiesen wurde. Dies zeigte sich in Abbauuntersuchungen mit dem aliphatischen Polyester SP 4/6. Im Gegensatz zu Lipasen aus *Pseudomonas spec.*, *Aspergillus oryzae* und *Candida cylindracea* konnte TfH auch Estergruppen in wasserlöslichen Polyesterspaltprodukten hydrolysieren, die während des Abbaus des festen Polyestermaterials entstehen. So resultierte der Abbau in einem nahezu vollständigen Umsatz der Estergruppen im Polyestermaterial [Kleeberg et al. 2005].

Die Aminosäuresequenz der 28 kDa großen TfH bestehend aus 260 Aminosäuren weist hohe Sequenzähnlichkeit mit Lipasen aus *Streptomyces albus* und *Streptomyces exfoliatus* von über 60 % auf. TfH zeigt das für Serinhydrolasen hochkonservierte Pentapeptid -Gly-His-Ser-Met-Gly-. Die katalytische Triade setzt sich aus Ser131, Asp175 und His209 zusammen. Der Anteil an hydrophoben Aminosäuren ist im Vergleich zu anderen Serinhydrolasen mit 42 % relativ hoch.

3.6 Rekombinante Produktion der Hydrolase aus *T. fusca* in *E. coli*

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zunächst Prozessstrategien zur Produktion der TfH in einem rekombinanten *E. coli* Stamm zu entwickeln. Im folgenden Abschnitt werden dazu die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe und von Dr. Joop van den Heuvel (Abteilung Strukturbiologie, HZI Braunschweig) näher erläutert, auf welche im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffen wurde. Anschließend werden verschiedene Verfahrensweisen zur Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* dargestellt. Da TfH durch ein *E. coli* spezifisches Signalpeptid am N-Terminus vom cytoplasmatischen in den periplasmatischen Raum transportiert wird, wird abschließend kurz auf die Proteinsekretionswege in *E. coli* eingegangen.

3.6.1 Herstellung des Expressionsvektors

Die TfH-Aminosäuresequenz wurde durch Sequenzierung bestimmt, und anschließend mittels des genetischen Codes in eine degenerierte DNA-Sequenz umgeschrieben. Basierend auf dieser DNA-Sequenz wurden Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation entworfen [Deckwer et al. 2001, Kleeberg 1999]. Diese PCR-Oligonukleotide wurden dann zur Identifizierung der für die TfH kodierenden DNA-Bereiche verwendet. Auf dem *T. fusca* Genom wurde ein Regulon mit zwei homologen Genen identifiziert, die *bta1* und *bta2* genannt wurden. Der kodierende DNA-Bereich von *bta1* wurde für die heterologe Rekombination ausgewählt, da

dieser mit dem von Kleeberg [1999] aufgereinigtem und sequenziertem Genprodukt die höchste Übereinstimmung aufwies. Das für *T. fusca* spezifische Signalpeptid am N-Terminus der *bta1* Sequenz wurde mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren durch das *E. coli* spezifische Signalpeptid *OmpA* (Signalpeptid des in der äußeren Zellwand lokalisiertem *OmpA*-Proteins [Movva et al. 1980]) ausgetauscht und abschließend in den Expressionsvektor pCytexP1 kloniert [Belev et al. 1991]. Dieser Austausch der Signalpeptide sollte zu einem Transport der Tfh in den periplasmatischen Raum führen. Auf dem Expressionsvektor pCytexP1-*OmpA-bta1* steht das *OmpA-bta1*-Gen unter der Kontrolle des Promotortandems λ_{PRPL} . Dieses wird durch den thermolabilen Repressor cIts857 reprimiert. Bei höheren Temperaturen wird der Repressor cIts857 inaktiviert, wodurch die Tfh-Produktion freigegeben wird. Im Falle des Repressors cIts857 sind bei beispielsweise 42 °C 50 % der Repressormoleküle inaktiviert sind [Okita et al. 1989]. Nach der Transformation des Expressionsvektors in *E. coli* wurde die heterologe Expression der Tfh mit Hilfe von Aktivitätsgelen erfolgreich nachgewiesen [Deckwer et al. 2001].

3.6.2 Prozessstrategien zur Produktion rekombinanter Proteine

Für die Produktion rekombinanter Proteine mit *E. coli* gibt es drei Verfahrensweisen: das Batch-Verfahren, das kontinuierliche Verfahren und das semi-kontinuierliche Verfahren. Zu dem semi-kontinuierlichen Verfahren werden alle Prozessstrategien gerechnet, die nicht in die ersten beiden Kategorien eingeordnet werden können, wie beispielsweise das Fed-Batch Verfahren [Yamane und Shimizu 1984].

Kultivierungen im Batch-Verfahren sind technisch am einfachsten zu realisieren. Alle für die Kultivierung nötigen Nährstoffe bis auf Sauerstoff (bei aeroben Prozessen) und gegebenenfalls Chemikalien für die pH-Korrektur befinden sich vor Kultivierungsbeginn im Reaktor [Yamane und Shimizu 1984]. Das Wachstum der Zellen verläuft unkontrolliert und weist einen typischen Verlauf auf (lag-, exponentielle, stationäre und Absterbe-Phase). Gebildete Produkte werden nach Kultivierungsende geerntet. Im Gegensatz dazu steht das kontinuierliche Verfahren, bei dem die Nährstoffe kontinuierlich dem Bioreaktor zugefügt werden, und Medium sowie Produkte mit der gleichen Rate aus dem Reaktor abgeführt werden. Das Fed-Batch Verfahren stellt eine Zwischenform dar. Hier werden kontinuierlich oder in Intervallen Nährstoffe in den Reaktor zugeführt, wobei jedoch kein Kulturmedium abgezogen wird.

Unter der Annahme, dass die spezifische Produktivität (q_p) der Zellen zur Produktion heterologer Proteine unabhängig von der Zelldichte (X) ist, ist es ein Ansatzpunkt für eine hohe Produktbildung (Q_p) im Reaktor, zunächst möglichst hohe Zelldichten zu erreichen.

$$Q_p = q_p \cdot X$$

Gleichung 3-1

Das Batch-Verfahren ist dafür meistens ungeeignet, da aufgrund der hohen Anfangskonzentrationen im Medium Substratinhibitionen, Sauerstofflimitation und Katabolitrepression auftreten können [Riesenberg und Guthke 1999, Riesenberg et al. 1991, Lee 1996, Shiloach und Fass 2005]. In Hochzelldichtekultivierungen wird daher durch eine kontrollierte Erhöhung der Biomasse unter substratlimitierenden Bedingungen (d.h. das Wachstum erfolgt unterhalb der maximalen Wachstumsrate μ_{\max}) versucht, die eben genannten Effekte zu umgehen.

Hochzelldichtekultivierungen werden häufig in zwei Phasen unterteilt. In der Batchphase ist das Bakterienwachstum ($\mu = \mu_{\max}$) durch ausreichende Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen nicht limitiert [Riesenberg 1991, Yamane und Shimizu 1984]. Das Ende der ersten Phase ist nach dem Verbrauch einer dieser Nährstoffquellen durch einen Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes im Kultivierungsmedium gekennzeichnet. Die sich anschließende Fed-Batch-Phase ist dann durch eine kontinuierliche Zufütterung von Glukose in einer limitierenden Konzentration bestimmt. Die Wachstumsrate der Zellen liegt hier unterhalb der kritischen Wachstumsrate (μ_{crit}), bei der keine Anreicherung giftiger Metabolite im Medium auftritt. Die Zufütterungsstrategie kann linear, exponentiell oder in einem Stufengradienten erfolgen.

3.6.3 Proteinsekretion in *E. coli*

In *E. coli* sind bisher drei Proteinsekretionswege bekannt: die Sec-abhängige sowie die Sec-unabhängige Proteinsekretion und der Twin-Arginine-Transport (TAT). Im Gegensatz zur den ersten beiden genannten Sekretionswegen, werden im TAT-Weg die Proteine im gefalteten Zustand aus dem Cytoplasma sezerniert [Mori und Ito 2001].

Der Großteil der Proteine wird über den Sec-abhängigen Transportweg über die cytoplasmatische Membran in das Periplasma sekretiert. Sekretorische Proteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz (18-30 Aminosäuren), die aus 3 Regionen, dem positiv geladenen

N-Terminus (N-Region), einem zentralen, hydrophoben Bereich (H-Region) sowie einem C-Terminus mit der Schnittstelle für die Signalpeptidase, zusammengesetzt ist [von Heijne 1990].

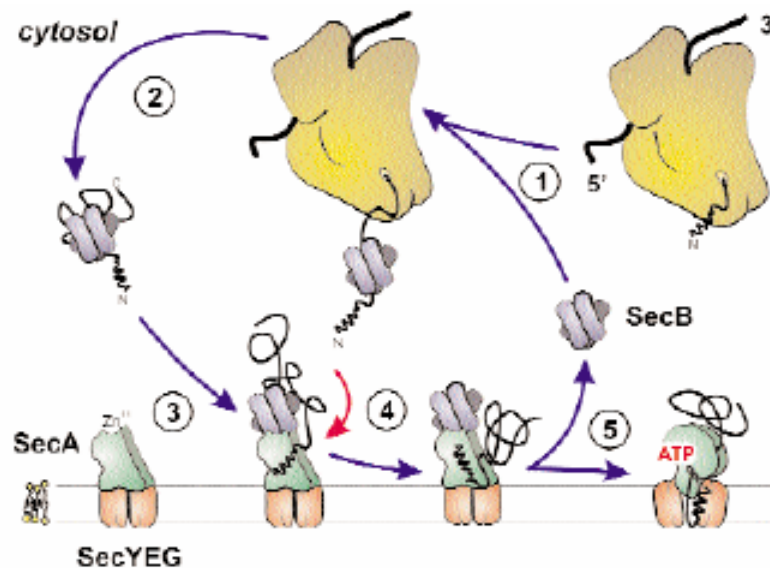


Abb. 3-5: Schematische Darstellung des Sec-abhängigen Transportweges. Das Chaperon SecB bindet an das Präprotein und führt dieses zu SecA, welches wiederum an den Transmembrankomplex SecYEG gebunden ist (1-3). Das Signalpeptid des Präproteins bindet an SecA, SecB löst sich von SecA (4). Durch die Bindung von ATP wird der Translokationsprozess initiiert. Durch wiederholte ATP-Bindung und -Hydrolyse inseriert und deinsertiert SecA in den SecYEG-Komplex und translokiert das Präprotein ins Periplasma (5). Abbildung aus Driessen et al. [2001] entnommen.

Das Chaperon SecB bindet während der Protein-Translation oder kurz danach an das zu sekretierende Präprotein (Protein mit Signalsequenz), stabilisiert dieses im ungefalteten Zustand und transportiert es zur cytoplasmatischen Membran (Abb. 3-5). Dort bindet SecB an die Translokations-ATPase SecA, welche wiederum über eine zweite Bindedomäne an den heterotrimeren Transmembrankomplex SecYEG assoziiert ist. Anschließend erfolgt eine Übertragung des Präproteins auf SecA, wodurch der SecB-SecA-Komplex aufgelöst wird. Gleichzeitig bindet ATP an SecA, wodurch der Translokationsprozess initiiert wird und SecA mit dem Präprotein in den Transmembrankomplex SecYEG inseriert. Hierbei wird das Präprotein mit einer Länge von ca. 20 Aminosäuren durch den Kanal geschleust. Während dieses Schrittes kommt es auch zur Abtrennung der Signalsequenz vom Präprotein. Durch die Hydrolyse von ATP geht SecA in die Ausgangskonformation zurück und translokiertes Protein verbleibt assoziiert am SecYEG-Komplex. Durch zyklisches Binden von SecA an das

zu sekretierende Protein und ATP-Hydrolyse wird das Protein stückweise ins Periplasma überführt [Driessen et al. 2001]. Unterstützt durch Proteine des Sekretionsapparates und periplasmatische lokalisierte Chaperone wird das reife Protein im Periplasma in seine korrekte dreidimensionale Struktur gefaltet.

3.7 Allgemeine Mechanismen des biologischen Abbaus von Polymeren

3.7.1 Biologisch abbaubare Polymere: Definition und Testverfahren

In der DIN V 54900-2 [1998] zur „Prüfung der Kompostierbarkeit von Kunststoffen“ ist eine Definition für bioabbaubare Kunststoffe gegeben. Demnach sind Kunststoffe bioabbaubar, wenn sämtliche organische Bestandteile einem vollständigen biologischen Abbau unterliegen. Biologische Endprodukte sind dabei natürlich vorkommende Stoffwechselprodukte wie Wasser, Kohlendioxid, Methan oder neue Biomasse. In Tab. 3-1 ist eine Aufstellung biologisch abbaubarer Polymere dargestellt, die im Rahmen einer Studie des „Franz-Patat-Zentrum“ entstanden ist [Witt et al. 1997].

Tab. 3-1: Einteilung biologisch abbaubarer Polymere nach Witt et al. [1997].

Gruppe	Vorteile	Nachteile	Beispiele
Natürliche Polymere	<ul style="list-style-type: none"> • nachwachsende Rohstoffe • z.T. preiswert 	<ul style="list-style-type: none"> • eingeschränkte Verarbeitung • eingeschränkte Anwendbarkeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Cellulose • Stärke • Polyhydroxybuttersäure
Modifizierte natürliche Polymere	<ul style="list-style-type: none"> • z.T. nachwachsende Rohstoffe • gute Materialeigenschaften 	<ul style="list-style-type: none"> • z.T. teuer • synthetische Modifizierung nur eingeschränkt kontrollierbar 	<ul style="list-style-type: none"> • Celluloseacetat • Stärkeacetat
Synthetische Polymere aus natürlichen Bausteinen	<ul style="list-style-type: none"> • nachwachsende Rohstoffe • gute Materialeigenschaften • Synthese gut kontrollierbar 	<ul style="list-style-type: none"> • teuer 	<ul style="list-style-type: none"> • Polymilchsäure
Synthetische Polymere aus petrochemischen Bausteinen	<ul style="list-style-type: none"> • sehr gute Materialeigenschaften • preiswert • strukturelle Vielfalt • schnelle Synthese 	<ul style="list-style-type: none"> • keine nachwachsenden Rohstoffe 	<ul style="list-style-type: none"> • aliphatische Polyester • Polyurethane • Polyamide • aliphatisch-aromatische Copolyester

Biologisch abbaubare Polymere werden hier in vier Gruppen unterteilt: natürliche Polymere aus nachwachsenden Rohstoffen; chemisch modifizierte natürliche Polymere aus nachwachsenden Rohstoffen; synthetische Polymere aus nachwachsenden Rohstoffen und synthetische Polymere aus petrochemischen Bausteinen.

Von der Bioabbaubarkeit abzugrenzen ist die Biokorrosion. Hierunter versteht man die Veränderung der Polymereigenschaften oder -struktur, die im Wesentlichen aufgrund von physikalischen und chemischen Prozessen entstehen und sich beispielsweise in einer Verfärbung oder Abnahme der Elastizität äußern können.

Zur Beurteilung der Bioabbaubarkeit wurden standardisierte Testmethoden entwickelt, die beispielsweise auf der Bewertung von visuellen Veränderungen des Polymers, Bestimmung des Polymergewichtes, Kohlendioxidbildung bzw. Sauerstoffverbrauch oder der Bestimmung der Polymerkettenlängen beruhen [Müller 2006]. Solche Testmethoden können unter Laborbedingungen (Labortests), unter realitätsnahen Bedingungen (Simulationstest) und unter Umweltbedingungen (Feldtests) durchgeführt werden. Der Vorteil der Feldtests liegt darin begründet, dass der Abbau unter realen Umweltbedingungen untersucht werden kann. Allerdings sind hier Einflussgrößen wie die Temperatur, pH und Feuchtigkeit variabel, und die Versuchszeiten von zumeist mehreren Wochen bis Monaten sehr lang. Mit Labortests lässt sich hingegen die Bioabbaubarkeit von Polymeren schnell und unter kontrollierten Bedingungen untersuchen. Systematische Untersuchungen, wie etwa zur Abbaukinetik und zur enzymatischen Mechanistik, sind mittels dieser Methodik möglich. Auf der anderen Seite ermöglichen solche Labortests lediglich eingeschränkte Aussagen zum Bioabbau in einer natürlichen Umgebung. Mit Hilfe der Simulationstests wird versucht, die Nachteile der eben genannten Testmethoden zu umgehen. Hier wird der Bioabbau der Polymere in einem natürlich vorkommenden Milieu wie beispielsweise in Kompost oder in Bodenproben in Bioreaktoren unter kontrollierten Bedingungen im Labor verfolgt.

3.7.2 Mikrobielle Abbaumechanismen

Der mikrobielle Abbau von Polymeren ist ein heterogener Prozess und unterliegt vielfältigen Einflussfaktoren, welche in Abb. 3-6 zusammengefasst sind. Der Bioabbau von Polymeren wird von umweltspezifischen, mikrobiellen und polymerspezifischen Einflussfaktoren bestimmt. Dabei lassen sich die einzelnen Faktoren in der Regel nicht voneinander trennen und beeinflussen sich gegenseitig. So determinieren zum Beispiel umweltspezifische Faktoren auch die mikrobielle Population, die am Bioabbau beteiligt ist.

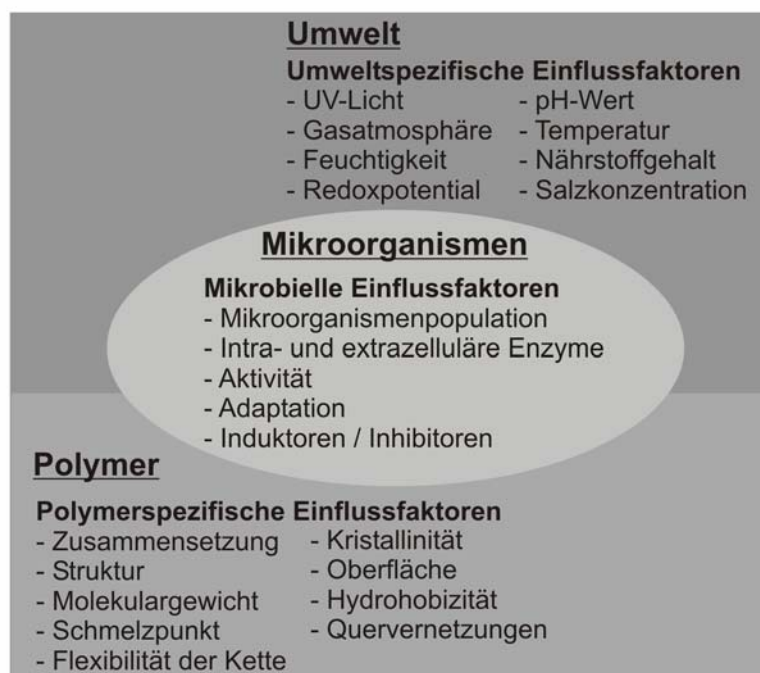


Abb. 3-6: Einflussfaktoren, die auf die Bioabbaubarkeit von Polymeren unter realen Umweltbedingungen Einfluss nehmen.

3.7.2.1 Umweltspezifische Einflussfaktoren

Physikalisch-chemische Parameter beeinflussen sowohl auf direktem Weg die Bioabbaubarkeit von Polymeren als auch die Mikroorganismenpopulation, die für den biologischen Abbau verantwortlich ist. Umweltspezifische Einflussfaktoren wie beispielsweise die Temperatur, der pH-Wert oder die Feuchtigkeit stellen entscheidende Bedingungen für die Ausbildung einer polymerabbauenden Mikroorganismenpopulation sowie für deren Vitalität dar. Hydrolytische Reaktionen (pH-Wert, Wassergehalt) und oxidative Reaktionen (UV-Licht, Redoxpotential) können auch direkt durch die Spaltung von Polymerkettenverbindungen und durch Entstehung neuer polarer Carbonyl- und

Carboxylgruppen zu einer Hydrophilisierung der Polymeroberfläche verbunden mit einer Einlagerung von Wasser und somit zum Aufquellen des Materials führen, was wiederum einen enzymatischen Angriff begünstigen kann. Des Weiteren hat eine physikalische Disintegration (Temperatur, mechanische Zerkleinerung) häufig eine Vergrößerung der Polymeroberfläche zur Folge, was ebenfalls zu einem verbesserten mikrobiellen Abbau führen kann. Umgekehrt können der Zerfall der Polymere in kleine Partikel oder die Metabolisierung der Polymere in wasserlösliche Intermediate umweltspezifische Faktoren verändern. Zudem ist eine Anreicherung von unter Umständen toxischen Polymerintermediaten möglich, die die Vitalität der Mikroorganismenpopulation negativ beeinflusst. Mikroorganismen können auf der anderen Seite auch Stoffwechselprodukte (z. B. Säuren) oder Enzyme freisetzen, welche die Bildung reaktiver Reagenzien in der Umgebung katalysieren oder Veränderungen der Umweltbedingungen bewirken [Lenz 1993].

3.7.2.2 Mikrobielle Einflussfaktoren

Eine Grundlage für den mikrobiellen Abbau von Polymeren ist das Vorhandensein von geeigneten Mikroorganismenpopulationen, die Enzyme synthetisieren, welche spezifisch in den Biodegradationsprozess eingreifen. Dabei spielt es zunächst keine Rolle, ob die Depolymerisation und anschließende Metabolisierung von den Mikroorganismen oder im Kometabolismus von einer Mikroorganismenpopulation durchgeführt wird [Kaplan et al. 1993]. Beim mikrobiellen Abbau von Polymeren ist zwischen natürlich vorkommenden Polymeren (dPHA, Cellulose, Chitin) und synthetischen Polymeren, die auch unter dem Begriff der Xenobiotika zusammengefasst werden können, zu unterscheiden. Für die erste Gruppe sind im Laufe der Evolution eine Reihe an Enzymen (dPHA-Depolymerasen, Cellulasen, Chitinasen) entstanden, die spezifisch zum Abbau dieser Polymere fähig sind. Im Gegensatz dazu stehen die Xenobiotika, die technisch anthropogenen Ursprungs sind, und somit „naturfremd“ sind. Für diese synthetischen Polymere gibt es daher nur wenige Mikroorganismenarten, die in der Lage sind, diese abzubauen. Häufig sind nur solche xenobiotische Polymere biologisch abbaubar, die in ihren Strukturen denen natürlich vorkommender Polymere ähneln [Schlegel 1992].

Der Bioabbau von Polymeren ist ein heterogener Prozess und bezieht sich meistens auf den Abbau von nicht wasserlöslichen festen Materialien (Abb. 3-7). Dies bedeutet, dass polymerabbauende Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Algen) Enzyme produzieren, die membrangebunden oder extrazellulär vorliegend die Makromoleküle in wasserlösliche

Intermediate zerkleinern, die dann von den Mikroorganismen durch die Zellmembran aufgenommen und metabolisiert werden können. Dabei kann der Abbau der Polymerkette vom Kettenende her (*Exo*-Enzyme) oder statistisch verteilt (*Endo*-Enzyme) erfolgen. Am Ende dieses Prozesses stehen Stoffwechselprodukte wie Wasser, Kohlendioxid, Methan (anaerober Abbau) bzw. ist neue Biomasse entstanden. Der Bioabbau der Polymere dokumentiert sich in der Regel in einer Erosion, d.h. einem Oberflächenabtrag der Polymeroberfläche, da die Enzyme nicht in das feste Material eindringen können.

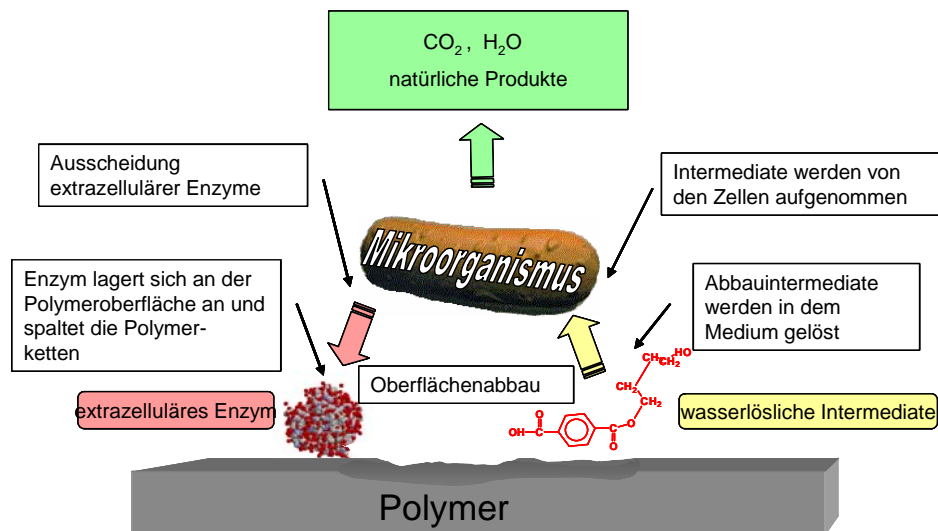


Abb. 3-7: Schematische Darstellung des mikrobiellen Abbaus synthetischer Polymere

3.7.2.3 Polymerspezifische Einflussfaktoren

Der biologische Abbau von Polymeren ist im Allgemeinen auf Polymerketten mit Heteroatomen beschränkt. Heteroatome wie Sauerstoff und Stickstoff im Polymerrückgrat bilden einen Angriffspunkt für eine enzymatische Hydrolyse. Nach Kawai nimmt die Hydrolysierbarkeit der Bindungen im Rückgrat in der Reihenfolge von Estern über Ethern und Amiden zu Urethanen hin ab [Kawai 1995]. Daher werden im Wesentlichen bioabbaubare Polymere mit C-O oder C-N Verknüpfungen verwendet. Nur wenige Ausnahmen sind bekannt. Der Abbau von Polyvinylalkohol erfolgt trotz seiner Kohlenstoffhauptkette durch eine primäre enzymatische Oxidation der Hydroxylseitengruppe mit anschließender dem Fettabbau analogen enzymatischen Spaltung der Hauptkette [Chiellini et al. 2003, Suzuki 1979]. Des Weiteren wird Naturkautschuk ebenfalls durch Mikroorganismen abgebaut. Hier wird angenommen, dass in einem primären enzymatischen Angriff durch Oxidation im Polymerrückgrat Doppelbindungen gespalten werden

[Arenskötter et al. 2001, Tsuchii und Takeda 1990, Bode et al. 2001]. Allerdings wird durch die Vulkanisierung des Naturkautschuks, die Abbaubarkeit drastisch reduziert. Zusätzlich können auch Additive im Polymer wie beispielsweise Oxidantien den Bioabbau begünstigen. So bewirken Oxidantien beim Bioabbau von Polyethylen einen Primärabbau der Polymerkette durch chemisch-radikalische Prozesse und ermöglichen so erst den finalen mikrobiellen Abbau [Kawai et al. 2002, Koutny et al. 2006].

Während die chemische Verknüpfung die grundsätzliche Bioabbaubarkeit bestimmt, ist zudem auch die Zusammensetzung der einzelnen Polymerbestandteile im Rückgrat von Relevanz. So tendieren Polyester mit aromatischen und verzweigten Kettenbereichen zu einer höheren Resistenz gegenüber einem mikrobiellen Abbau [Aminabhavi et al. 1990]. Copolymere aus aliphatischen und aromatischen Bestandteile sind jedoch in Abhängigkeit von ihrem Aromatenanteil einem mikrobiellen Angriff zugänglich, wobei die Abbaugeschwindigkeit mit zunehmendem Aromatenanteil sinkt [Tokiwa und Suzuki 1978, Witt 1996]. Als Erklärung für niedrige Abbaugeschwindigkeit wird häufig die geringe Flexibilität der Polymerkette mit aromatischen Kettenbereiche angegeben, die das Einpassen in das aktive Zentrum des hydrolytischen Enzyms beeinträchtigt [Huang 1985].

In der Regel lassen sich Polyester mit einer aliphatischen Kette besser abbauen als Polyester mit aromatischen Komponenten [Müller et al. 2001, Tokiwa und Suzuki 1977]. Allerdings ist die chemische Primärstruktur eng mit physikalischen Polymereigenschaften wie dem Schmelzpunkt, oder der Kristallinität verknüpft und eine Beeinflussung des biologischen Abbaus ist demnach nicht zwingendermaßen direkt auf die chemische Primärstruktur zurückzuführen. So zeigten sowohl Tokiwa und Suzuki [1981] als auch Marten et al., [2003] dass zwischen dem Schmelzpunkt aliphatischer Polyester ein Zusammenhang hinsichtlich der Abbaubarkeit mittels Lipasen besteht. Für aliphatisch-aromatische Copolyester sind vergleichbare Beobachtungen gemacht worden [Witt et al. 1995].

Ein weiterer Faktor, der die Abbaugeschwindigkeit von Polymeren bestimmt, ist die Kristallinität in den semikristallinen Polymeren [Kaplan et al. 1993, Huang 1985, Parikh et al. 1993, Iwata und Doi 1999, Marten et al. 2003]. Anhand verschiedenster Polymere wie dP(3HB), SP 4/4, PCL und Copolyestern wurde nachgewiesen, dass mit zunehmender Kristallinität, d.h. einem erhöhten Anteil kristalliner Domänen im Polymer, die Abbaurate abnimmt [Abe und Doi 1999, Yoo und Im 1999, Huang 1985, Seretoudi et al. 2002]. Zusätzlich zur Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit von der Kristallinität wurde gezeigt, dass innerhalb eines Polymers die kristallinen Bereiche langsamer als die amorphen abgebaut werden [Eldsäter et al. 2000].

Marten et al. [2003, 2005] führten das Abbauverhalten von Polyestern auf die „Mobilität“ der Polymerketten im Polymerverbund semikristalliner Polymere zurück. Da Polyester teilkristallin sind, finden sich neben geordneten kristallinen Regionen auch amorphe Bereiche, in denen die Polyesterketten ungeordnet vorliegen. Durch eine höhere Mobilität der Ketten erfolgt der enzymatische Angriff zunächst vorwiegend in amorphen Bereichen [Iwata und Doi 1999, Tserki et al. 2006, Seretoudi et al. 2002]. Als Folge dieser vornehmlichen Erosion amorpher Bereiche reichern sich schlecht abbaubare Kristallite an der Polymeroberfläche an, die den weiteren enzymatischen Abbau entscheidend kontrollieren [Eldsäter et al. 2000]. Nach Marten et al. [2003, 2005] sind die Polyesterketten in den kristallinen Domänen relativ eng in die Kristallstruktur eingebunden. Sie können somit nur begrenzt eine Konformation annehmen, die es ihnen ermöglicht sich in das aktive Zentrum des an der Oberfläche liegenden Enzyms einzupassen, um so die Katalyse der hydrolytischen Spaltung zu induzieren. Durch eine Temperaturerhöhung, insbesondere in der Nähe des Polyesterschmelzpunktes, kommt es zu einer signifikanten Mobilisierung der Polyesterketten, was zu einer beschleunigten Substrat-Enzym-Komplexbildung und damit zu einer effektiven Hydrolyse führt.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Soweit nicht anderweitig erwähnt, entsprechen alle Chemikalien der Firma Merck, Fluka, Roth und Sigma-Aldrich der Analysenqualität oder dem höchstmöglichen Reinheitsgrad. Es wurde milliQ-H₂O zum Lösen verwendet.

4.2 Bakterienstämme und Plasmide

Zur Produktion der rekombinanten *Thermobifida fusca* Hydrolase (rTfH) kam der Mikroorganismus *Escherichia coli* TG1 (DSM 6056) zum Einsatz. *E. coli* TG1 ist thiaminauxotroph und durch den Genotyp *supE hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB) F'*[*traD36 proAB*⁺ *lacI*^q *lacZΔM15*] charakterisiert [Carter et al. 1985].

Restriktionsreaktion

Mit dem Ziel, ein His₆-Tag an das C-terminale Ende des TfH-Gens *bta1* zu klonieren, wurde der bereits vorhandene Expressionsvektor pCytexP1-*OmpA-bta1* [Deckwer et al. 2001] benutzt (Kap. 3.5). In einem ersten Schritt wurde das *OmpA-bta1*-Gen aus dem Expressionsvektor mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *EcoRI* herausgeschnitten. Die entsprechenden Reaktionspuffer wurden nach Angaben der Hersteller angesetzt (New England Biolabs, USA). Die entstandenen DNA-Fragmente mit einer Länge von 876 bp und 4949 bp wurden elektrophoretisch mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt (Kap. 4.6.3).

PCR-Reaktion

Nach dem Herausschneiden des kleineren DNA-Fragments (876 bp) aus dem Gel und anschließender Extraktion (JETQUICK Gel Extraction Spin Kit, GENOMED GmbH, Germany) wurde das His₆-Tag mittels PCR an das 3'-Ende der DNA-Sequenz angefügt. Hierbei wurden die Primersets *bta1*-rev (5'-TAC TTA GGA TCC TTA TCA GTG GTG GTG GTG GTG CTC GAG GAA CGG GCA GGT GGA GCG-3') und *bta1*-for (5'-GTC ATG GGC CAC TCC ATG GGC-3') verwendet. Zusätzlich zu dem His₆-Tag wurden zwei Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *AvaI* am 3'-Ende der *bta1* DNA-Sequenz eingefügt. DNA-Verlängerung und -Amplifikation wurden mittels PCR (*polymerase chain reaction*) durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde laut Herstellerangaben gemischt (New England Biolabs, USA). Nach einer zweiminütigen Denaturierung des DNA-Fragments bei 95 °C wurde VENT-DNA-Polymerase (New England Biolabs, USA) dazugegeben und folgender Zyklus 30mal durchlaufen: 30 s bei 95 °C, 30 s bei 50 °C, 2 min bei 55 °C. Eine 5-

minütige Elongationsphase bei 55 °C vervollständigte die PCR. Das PCR-Produkt *bta1-His₆* wurde anschließend mit dem DNA Reinigungskit (Jetquick PCR Purification Kit, Genomed GmbH, Germany) gereinigt. Nach elektrophoretischer Auftrennung des DNA-Fragments in einem Agarosegel wurde durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard die Größe des PCR-Amplifikates abgeschätzt.

Ligationsreaktion

Der zweite Schritt umfasste die Ligation von *bta1-His₆* mit dem Expressionsvektor. Dazu wurden *bta1-His₆* und pCytexP1-*OmpA-bta1* getrennt voneinander mit den Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Bam*HI geschnitten. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden über ein Agarosegel getrennt und nach Herausschneiden der entsprechenden Banden aus dem Gel extrahiert. Die Ligationsreaktion erfolgte mit der T4-DNA-Ligase unter Berücksichtigung der Herstellerangaben (Fermentas, Deutschland) für 2 h bei 37 °C und anschließender Inkubation über Nacht bei 16 °C.

Der entstandene Expressionsvektor pλTfH (pCytexP1-*OmpA-bta1-His₆*) (Abb. 4-1) wurde mit Hilfe der Elektroporation in kompetente *E. coli* TG1 transformiert (Kap. 4.6.4).

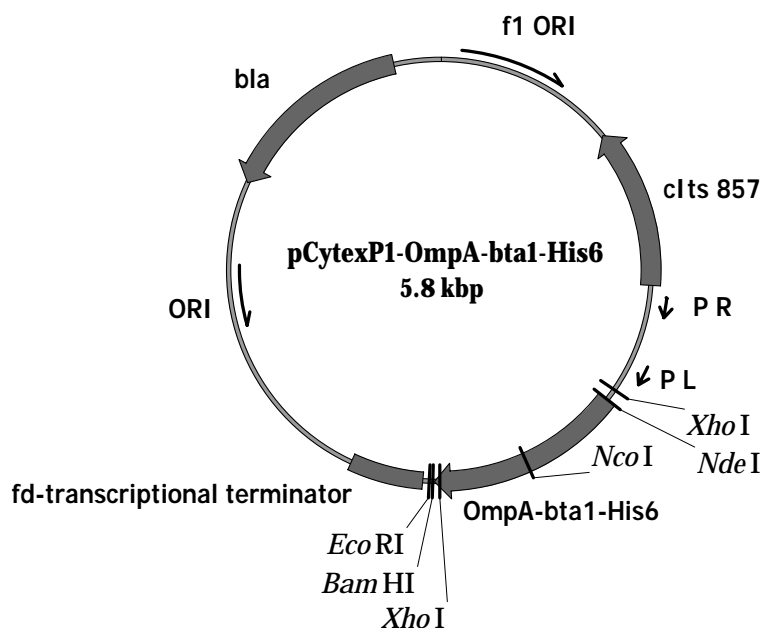


Abb. 4-1: Expressionsvektor pλTfH (pCytexP1-*OmpA-bta1-His₆*). Das Promotortandem aus dem λ-Phagen *P_RP_L* steht unter der Kontrolle des thermolabilen Repressors *clts857*. Zusätzlich ist die Resistenzkassette mit der Gensequenz für die β-Lactamase (*bla*), der Replikationsstartpunkt *ori*, der Terminator des Phagen *fd* und der *f1-ori* zur Herstellung von Einzelstrang-DNA gezeigt.

Vektorkontrolle

Zur Identifizierung positiver *E. coli* TG1: p λ TfH Klone wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe einer Mini Präparation (JETSTAR Plasmid Kit, Genomed, Germany) nach alkalischer Lyse der Bakterienzellen [Sambrook und Russell 2001] aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wurde durch den Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Xho*I überprüft. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden nach Auftrennung im Agarosegel ausgewertet. Parallel zum Restriktionsansatz wurde ein kurzer Bereich des Expressionsvektors sequenziert. Folgende Sequenzierungsprimer standen dafür zur Verfügung: *pCYTEXPI*-rev (5'-GTA GCC AGC GCG TCG GGC TCT AGA CGC GAT TGT CGA CTT ACC TAC TCA GAA-3') und *TFSP1*-for (5'-GAC ACC ATC ACC ACC CTC GAC-3'). Nach Auswahl einiger positiver Expressionsvektoren wurden die Plasmide dieser Klone nochmals durch einen Restriktionsverdau mit *Xho*I und *Bam*HI/*Nco*I überprüft.

Die Expression der rTfH steht unter Kontrolle des starken Promotortandems λ p_{RP}L, der durch den thermolabilen Repressor cIts857 reprimiert wird. Optimale Induktionsbedingungen dieses Promotors sind bei einer Temperatur von 42 °C gegeben. Allerdings wurde neben dieser Induktionstemperatur auch eine Induktion bei 39 °C näher untersucht, um die Hitzestressantwort zu minimieren.

4.3 Nährmedien

Alle Medienbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst. Die Sterilisation der Medien erfolgte bei 121 °C und 1 bar Überdruck im Autoklaven, wenn nicht anders beschrieben. Der pH-Wert wurde vor der Sterilisation mit 0,1 M Natronlauge oder 0,1 M Salzsäure eingestellt. Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium Agar (20 g L⁻¹) hinzugefügt.

4.3.1 LB-Medium

Luria-Bertani Medium wurde für Kultivierungen im Schüttelkolben und für Batchkultivierungen im Reaktor (Biostat B2) sowie als Vorkulturmedium verwendet (Tab. 4-1.). Bei Bedarf wurde zum sterilen LB-Medium sterilfiltrierte Ampicillinlösung (Minisart RC15, cut off 0,2 μ m, Sartorius, Deutschland) in einer Endkonzentration von 100 mg mL⁻¹ dazugegeben.

Tab. 4-1: LB-Medium

Bacto-Trypton (Ref. 211705)	10 g L ⁻¹
Bacto-Hefe-Extrakt (Ref. 212750)	5 g L ⁻¹
NaCl	5 g L ⁻¹
Glukose	0,8 g L ⁻¹

Das Medium wurde auf pH 7 eingestellt und anschließend autoklaviert.

4.3.2 Minimalmedium M9

Das Minimalmedium M9 (DSMZ, Medium 382) wurde für Kultivierungen im Schüttelkolben und als Vorkulturmedium für Batch- und Hochzelldichtekultivierungen im synthetischen HDF-Kulturmedium verwendet. Unter sterilen Bedingungen wurde aus einer 10-fach konzentrierten M9-Salzlösung das 1-fach konzentrierte Medium hergestellt (Tab. 4-2). Zusätzlich wurde Magnesiumsulfat, Calciumchlorid, Glukose, Thiamin und Ampicillin steril zugesetzt (Tab. 4-3).

Tab. 4-2: 10 X M9-Salze

Na ₂ HPO ₄	60 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	30 g L ⁻¹
NH ₄ Cl	10 g L ⁻¹
NaCl	5 g L ⁻¹

Das Medium wurde auf pH 7,4 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Tab. 4-3: M9-Minimalmedium

10 x M9-Salze	100 mL
1 M MgSO ₄	1 mL
0,1 M CaCl ₂	1 mL
20% Glukose (sterilfiltriert)	10 mL
1 M Thiamin (sterilfiltriert)	1 mL
Ampicillin (sterilfiltriert)	100 mg mL ⁻¹
milliQ-H ₂ O	900 mL

4.3.3 Synthetisches Kulturmedium (HDF-Medium)

Das HDF-Medium wurde für Batch- und Hochzelldichtekultivierungen im Reaktor (Biostat B2) eingesetzt. Die Mediumzusammensetzung basierend auf Korz et al. [1995] ist in Tab. 4-4 aufgelistet. Um Salzausfällungen und eine Maillardreaktion zu vermeiden, wurden die Glukoselösung und die MgSO_4 -Lösung getrennt von den anderen Medienbestandteilen hitzesterilisiert. Ampicillin und Thiamin wurden sterilfiltriert und erst vor Beginn der Kultivierung dem Kulturmedium zugesetzt. Damit keine hohen Ammoniumkonzentrationen im Medium auftraten, erfolgte die pH-Korrektur in zwei Schritten. Vor der Sterilisation des Mediums wurde mit 5 M NaOH ein pH-Wert von 6,8, welcher auch während der Kultivierung als Sollwert gegeben war, eingestellt. Jede weitere pH-Korrektur erfolgte mit NH_3 (25 % w/w).

Tab. 4-4: Synthetisches Kulturmedium (HDF-Medium) und die Zusammensetzung der Feedlösung in der Hochzelldichtekultivierung

Medienkomponenten	HDF-Medium	Feedlösung
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$,	4 g L ⁻¹	— —
KH_2PO_4 ,	13,3 g L ⁻¹	— —
Citronensäure,	1,7 g L ⁻¹	— —
Glukose,	25 g L ⁻¹	300 g L ⁻¹
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,	1,2 g L ⁻¹	7,6 g L ⁻¹
$\text{Fe(III)citrat} \cdot \text{H}_2\text{O}$,	100 mg L ⁻¹	16,2 mg L ⁻¹
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,	2,5 mg L ⁻¹	1,5 mg L ⁻¹
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,	15 mg L ⁻¹	8,9 mg L ⁻¹
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,	1,5 mg L ⁻¹	0,9 mg L ⁻¹
H_3BO_3 ,	3 mg L ⁻¹	1,9 mg L ⁻¹
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,	2,5 mg L ⁻¹	1,5 mg L ⁻¹
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,	13 mg L ⁻¹	6,1 mg L ⁻¹
EDTA,	8,4 mg L ⁻¹	4,9 mg L ⁻¹
Thiaminhydrochlorid,	4,5 mg L ⁻¹	4,5 mg L ⁻¹
Ampicillin,	100 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹
Sigma Antifoam 204,	0,1 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹

Die Komponenten der Feedlösung wurden nacheinander in milliQ-H₂O gelöst und anschließend sterilfiltriert (Sterivex-GP, cut off: 0,22 µm, Millipore, Deutschland). In den Hochzelldichtekultivierungen wurde mit Feedlösungen unterschiedlicher Glukosekonzentration gearbeitet. Bis auf Ampicillin und dem Antischaummittel wurden die anderen Medienbestandteile entsprechend der verwendeten Glukosekonzentration angepasst.

4.4 Mikrobiologische Techniken

4.4.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung über einen längeren Zeitraum erfolgte in Form von Glycerinkulturen. Dazu wurden die Bakterienstämme über Nacht im Vorkulturmedium bei 30 °C und 180 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die frische Flüssigkultur wurde anschließend mit 10 % (v/v) Glycerin versetzt und in Portionen zu je 1 mL in Eppendorfgefäßen bei -80 °C eingefroren.

4.4.2 Vorkulturen

Die Kultivierung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, im jeweiligen Vorkulturmedium in 100 mL Erlenmeyerkolben mit einem Kulturvolumen von 25 mL bei 30 °C und 180 rpm auf einem Schüttler über 12-14 h. Das Animpfen der Vorkultur erfolgte direkt aus der Gefrierkultur mit einer Endkonzentration von 1 % (v/v) des Kulturvolumens.

4.4.3 Kultivierung im Schüttelkolben

Die Bakterienstämme wurden in 250 mL Erlenmeyerkolben mit einem Kulturvolumen von 50 mL bei 30 °C und 180 rpm auf einem Schüttler inbubiert. Das Animpfvolumen wurde so gewählt, dass zu Beginn der Kultivierung eine optische Dichte (OD_{600 nm}) von etwa 0,1 vorlag. Die Induktion der rekombinanten Proteinproduktion erfolgte durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 30 °C auf 39 °C bzw. 42 °C.

4.4.4 Bioreaktorsystem und Kultivierung im Bioreaktor

4.4.4.1 Bioreaktor

Für die Batch- und Hochzelldichtekultivierungen wurde der Bioreaktor Biostat B2 (Sartorius BBI Systems, Melsungen, Deutschland) verwendet. Die geometrischen Kenngrößen sind in Tab. 4-5 zusammengefasst.

Die Durchmischung des Kulturmediums gewährleisteten zwei 6-Blattscheibenrührer, wobei die Rührerwelle von einem Gleichstrommotor mit einer Maximaldrehzahl von 1200 rpm betrieben wurde. Über eine Temperaturmesssonde, eine pH-Einstabmesskette (Mettler-Toledo, Schweiz) sowie einen pO_2 -Sensor (Mettler-Toledo, Schweiz) erfolgte die Regelung.

Tab. 4-5: Geometrische Kenngrößen des Biostat B2

Gesamtvolumen	3 L
Arbeitsvolumen	2 L
Innendurchmesser	130 mm
Gesamthöhe H	285 mm
Füllhöhe h	104-208 mm
Rührerdurchmesser d	53 mm
Rührerblatthöhe h_R	100 mm
h / D	0,8-1,6
d / D	0,41

4.4.4.2 Anlagenkonfiguration

Der Aufbau der Versuchsanlage ist in Abb. 4-2 schematisch dargestellt. Der Reaktor wurde über die Biostat-Kontrolleinheit und einen Leitrechner gesteuert. Datenerfassung und Parameterregelung erfolgten über das Prozessleitsystem MFCS/win 2.0 (BBI Systems, Melsungen, Deutschland).

Die Temperierung des Reaktors wurde über einen Reaktordoppelmantel gewährleistet. Um die Sterilität der Zu- und Abluft sicherzustellen, wurde diese durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von $0,2 \mu m$ geleitet. Der pH-Wert wurde während der Kultivierung über die Zugabe von Lauge oder Säure reguliert. Der Verbrauch des Laugenvolumens wurde gravimetrisch verfolgt. Aufgrund des nahezu vernachlässigbaren Säurekonsums, der sich auf die Säurebildung der Zellen während der Kultivierung zurückführen lässt, wurde der

Säureverbrauch nicht erfasst. Die Abluft wurde über einen externen Thermostaten auf 2 °C gekühlt, anschließend über eine gasdichte Schottflasche (Schaumfalle) und einer Waschflasche (Kondensatfalle), die sich in einem Thermostaten mit einer Wassertemperatur von 9 °C befand, in den Abgasanalysator (Maihak, Hamburg, Deutschland) geleitet. Die Schlauchverbindungen des gesamten Systems bestanden aus Silikonschläuchen, mit Ausnahme der Abluftstrecke vom Bioreaktor bis zum Abgasanalysator (Tygonschläuche). Die Pumpe für die Feedlösung wurde vorher mit den entsprechenden Silikonschläuchen kalibriert.

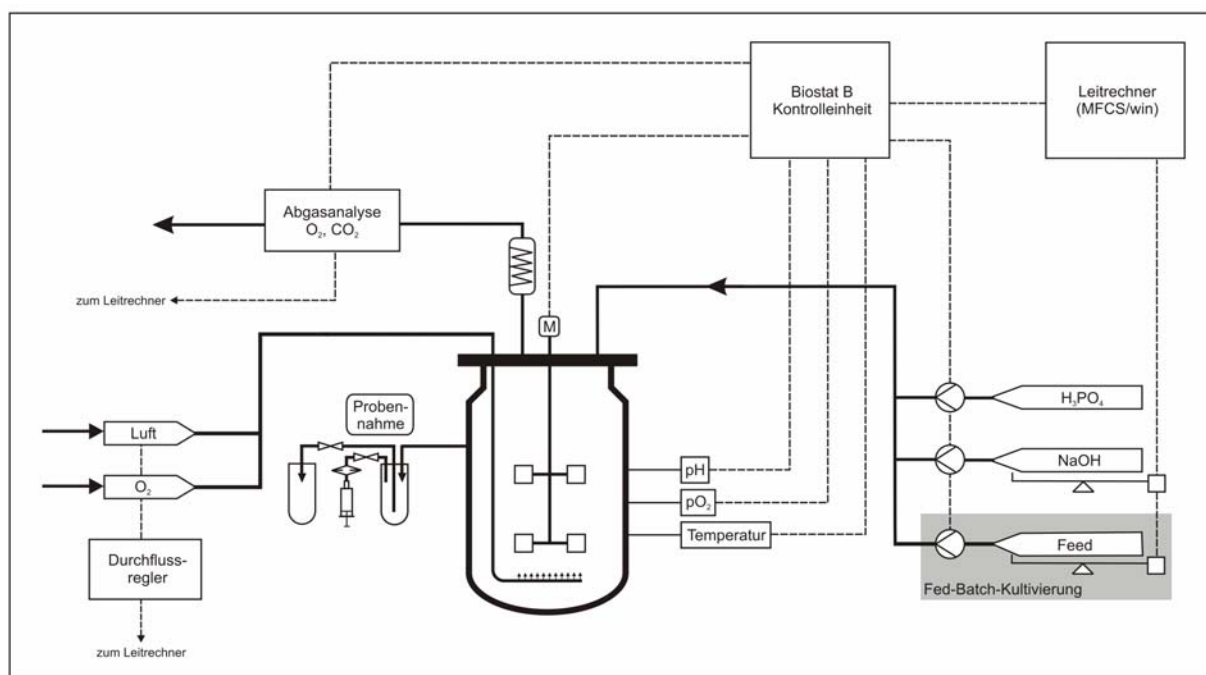


Abb. 4-2: Versuchsaufbau für die Batch- und Fed-Batch-Kultivierung

Die Produktion der rekombinanten TfH erfolgte im 1 L Maßstab. Die Anfangsbedingungen für die Kultivierungen waren eine Begasungsrate von 1 mL min^{-1} und eine Rührerdrehzahl von 500 rpm bei einer Temperatur von 30 °C und einem pH-Wert von 6,8. Die pH-Regulierung erfolgte über die Zugabe von 25 % NH_3 (LB-Medium: 5 M NaOH) und 1 M H_3PO_4 . Der Gelöstsauerstoff betrug mindestens 20 % Sättigung und wurde automatisch mittels der Rührerdrehzahl und der Begasungsrate geregelt. Bei Bedarf wurde die Zuluft mit reinem Sauerstoff angereichert. Das Animpfvolumen betrug in der Regel 1 % (v/v) des Kultivierungsvolumens aus einer Vorkultur mit einer optischen Dichte ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) zwischen 3 und 4. Bei Schaumbildung wurde manuell ca. 10 μL steriles Antischaummittel zugegeben.

4.4.4.3 Batchkultivierung

Die Batchkultivierungen wurden sowohl im LB-Medium als auch in synthetischem HDF-Medium durchgeführt. Die Induktion der rekombinanten Tfh-Synthese erfolgte durch Temperaturerhöhung von 30 °C auf 39 °C bzw. 42 °C.

4.4.4.4 Hochzelldichtekultivierung

Die Hochzelldichtekultivierungen erfolgten nach der Methode von Korz et al. im Fed-Batch-Verfahren in synthetischem Kulturmedium [Korz et al. 1995]. Die Fed-Batch-Kultivierung wurde zum Ende der Batchphase, die durch einen scharfen Anstieg des Gelöstsauerstoffs gekennzeichnet ist, initiiert. Die Zufütterungsrate F (L h^{-1}) erfolgte exponentiell mit einer spezifischen Wachstumsrate $\mu=0,12 \text{ h}^{-1}$ nach der Gleichung 4-1, wobei $(XV)_0$ die Biomasse (g) zu Beginn der Fed-Batch-Phase, t_f die Zeit (h) nach Beginn der Fed-Batch-Phase, $Y_{x/s}$ der Biomasseertragskoeffizient mit $0,4 \text{ g g}^{-1}$ und S die Glukosekonzentration in der Feedlösung (g L^{-1}) ist.

$$F_{\text{glc}} = \frac{\mu_{\text{set}} (XV)_0 e^{\mu_{\text{set}} t_f}}{Y_{X/S} S} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

Der Erhaltungskoeffizient wurde nicht in die Berechnung der Zufütterungsrate mit einbezogen, was zu einer kleineren tatsächlichen spezifischen Wachstumsrate führen kann. Die Zufütterungsrate wurde bei Volumenänderungen automatisch durch die MFCS/win-Software angepasst. Die Induktion der rekombinanten Tfh-Synthese erfolgte bei einer Biotrockenmasse von etwa 40 g L^{-1} durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 30°C auf 39 °C. Die Zufütterungsrate wurde nach der Induktion entweder auf ein lineares Zufütterungsprofil mit der Rate, die zu Beginn des Induktionszeitpunktes vorlag, fortgesetzt oder weiterhin nach Gleichung 4-1 berechnet.

4.4.4.5 Berechnung von Prozessparametern

Sauerstoffaufnahme

Die Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} (g (L h)⁻¹) wurde für *E. coli* TG1 aus der Abgasbilanz nach Gleichung 4-2 berechnet:

$$Q_{O_2} = \frac{\dot{V}_G \cdot M_{O_2}}{V_L \cdot V_N} \cdot \left[X_{O_2}^e - X_{O_2}^a \cdot \left(\frac{1 - X_{CO_2}^e - X_{O_2}^e}{1 - X_{CO_2}^a - X_{O_2}^a} \right) \right] \quad \text{Gleichung 4-2}$$

Bei der Begasung mit Luft (\dot{V}_{Luft} , L) und reinem Sauerstoff (\dot{V}_{O_2} , L) gilt für den eintretenden Luftstrom (\dot{V}_G , L):

$$\dot{V}_G = \dot{V}_{Luft} + \dot{V}_{O_2} \quad \text{Gleichung 4-3}$$

und:

$$X_{CO_2}^e = \frac{\dot{V}_{Luft} \cdot 0,0003}{\dot{V}_G} \quad \text{Gleichung 4-4}$$

sowie:

$$X_{O_2}^e = \frac{\dot{V}_{Luft} \cdot 0,2094 + \dot{V}_{O_2}}{\dot{V}_G} \quad \text{Gleichung 4-5}$$

zur Berechnung der Kohlendioxid- und Sauerstoffkonzentration in der Bioreaktorzuluft.

Durch Integration der Sauerstoffaufnahme erhält man den Sauerstoffverbrauch:

$$O_2 - \text{Verbrauch} = \int_{t_0}^t Q_{O_2} \cdot dt \quad \text{Gleichung 4-6}$$

Kohlendioxidbildung

Analog zu der Sauerstoffaufnahme (Gleichung 4-2) ergibt sich aus der Abgasbilanz die Kohlendioxidbildungsrate Q_{CO_2} (g (L h)⁻¹):

$$Q_{CO_2} = \frac{\dot{V}_G \cdot M_{CO_2}}{V_L \cdot V_N} \cdot \left[X_{CO_2}^e - X_{CO_2}^a \cdot \left(\frac{1 - X_{CO_2}^e - X_{O_2}^e}{1 - X_{CO_2}^a - X_{O_2}^a} \right) \right] \quad \text{Gleichung 4-7}$$

Durch die Integration erhält man das produzierte Kohlendioxid:

$$\text{CO}_2 - \text{Bildung} = \int_{t_0}^t Q_{\text{CO}_2} \cdot dt \quad \text{Gleichung 4-8}$$

Respirationskoeffizient

Der Respirationskoeffizient (RQ) berechnet sich aus Gleichung 4-2 und Gleichung 4-7, multipliziert mit den entsprechenden Molmassen für Sauerstoff und Kohlendioxid:

$$\text{RQ} = \frac{Q_{\text{CO}_2}}{Q_{\text{O}_2}} \cdot \frac{M_{\text{O}_2}}{M_{\text{CO}_2}} \quad \text{Gleichung 4-9}$$

Kohlenstoff-Bilanz

Um die Genauigkeit der während der Kultivierung erhobenen Daten zu überprüfen, wurde eine Kohlenstoff-Bilanz erstellt. Das Ergebnis der Kohlenstoff-Bilanz sollte bei einer vollständigen Erfassung 100 % betragen, wobei eine Abweichung von 5 % durch Messfehler auftreten kann. In die Berechnung der Kohlenstoff-Bilanz wurden die gebildete Biomasse (c_{BTM}) multipliziert mit dem molaren Kohlenstoffanteil von 0,45, die produzierte Kohlendioxid-Konzentration (c_{CO_2}), die metabolisierte Glukosekonzentration sowie die Metabolite (Pyruvat, Succinat, Propionat, Formiat, Acetat, Isobutyrat) multipliziert mit dem Quotienten aus dem molaren Kohlenstoffanteil (a , mol mol^{-1}) und dem Molekulargewicht (M , g mol^{-1}) der jeweiligen Substanz ins Verhältnis zur zugeführten Glukosekonzentration (c_i) gesetzt.

$$\text{C - Bilanz} = \frac{c_{\text{BTM}} \cdot 0,45 + \sum_i c_i \frac{a_i}{M_i}}{c_{\text{Glc}} \cdot \frac{a_{\text{Glc}}}{M_{\text{Glc}}}} \quad \text{Gleichung 4-10}$$

Biomasseertragskoeffizient

Der Biomasseertragskoeffizient ($Y_{X/S}$) gibt an, wie effizient der Organismus die angebotene Glukose metabolisiert und wird aus der erzeugten Biomasse (X , g L^{-1}) pro aufgenommenes Substrat (S , g L^{-1}) berechnet.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad \text{Gleichung 4-11}$$

4.5 Proteinaufarbeitung

Die Aufarbeitung der rekombinanten TtH erfolgte aus dem Kulturüberstand, dem Periplasma und dem Cytoplasma. Das Kulturmedium wurde aus dem Bioreaktor mit einer Pumpe (Watson/Marlow, England) in ein vorgekühltes, auf Eis stehendes Gefäß gepumpt. Die Zellen aus den Kultivierungen (Batch-Kultivierung, Hochzelldichtekultivierung) wurden mittels Zentrifugation (5000 rpm, 30 min, 4 °C) in der Kühlzentrifuge (Suprafuge 22; Rotor HFA 14.290; Heraeus, Deutschland) vom Kulturüberstand abgetrennt. Anschließend wurden die Zellen dreimal in eiskaltem PBS Puffer (Tab. 4-6) gewaschen. Die Aufbewahrung des Kulturüberstandes und der Zellen erfolgte bei -20 °C bzw. -80 °C.

Tab. 4-6: PBS-Puffer nach Sambrook und Russell [2001].

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

Die Pufferbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst und die Pufferlösung wurde auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

Zur Bestimmung der rTtH-Aktivität im Kulturüberstand, im Periplasma bzw. in der löslichen und unlöslichen Proteinfraction im Cytoplasma während der Kultivierung (Kultivierung im Schüttelkolben, Batch-Kultivierung, Hochzelldichtekultivierung) wurde ein definiertes Volumen Kulturbrühe aus dem Schüttelkolben/Bioreaktor entnommen. Die Zellen wurden vom Kulturmedium in einer Kühltischzentrifuge (Biofuge fresco, Rotor Nr. 3325B, Heraeus, Deutschland) bei 13000 rpm (5 min, 4 °C) abgetrennt.

4.5.1 Zellaufschlussmethoden

4.5.1.1 Osmotischer Schock

10 OD-Äquivalente Zellmaterial (der entsprechende Volumenanteil wurde zuvor der Kultur entnommen und zentrifugiert) wurden in 1 mL eiskaltem Puffer (Tab. 4-7) resuspendiert und nach zehnminütiger Inkubation und leichtem Rotieren bei Raumtemperatur (20-25 °C) zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Zentrifugationsüberstand wurde vom Zellpellet getrennt und bei 4 °C aufbewahrt. Das resultierende Zellpellet wurde daraufhin wieder in 1 mL eiskalter 5 mM MgSO₄-Lösung aufgenommen und 10 min bei ständiger Kühlung im

Wasserbad bei 4 °C und leichten Rotieren inkubiert. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Zentrifugationsüberstand abgenommen und mit dem Überstand aus dem ersten Schritt vereint. Dieser bildete die periplasmatische Proteinfraction.

Für die Proteinaufarbeitung der rTfH wurden, wenn nicht anders erwähnt, 37 g Zellmaterial (entspricht 10000 OD-Äquivalente) verwendet. Die notwendigen Puffervolumina wurden dementsprechend angepasst.

Tab. 4-7: Pufferlösung für den osmotischen Schock

Tris-HCl	30 mM
EDTA	1 mM
Sacharose	20 % (w/v)

Die Pufferbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst und die Pufferlösung wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.

4.5.1.2 Chemischer Zellaufschluss

Der chemische Zellaufschluss mit einer Detergenzienlösung (BugBuster, Novagen, Deutschland) wurde zur Bestimmung der rTfH-Aktivität in der löslichen und unlöslichen Proteinfraction des Cytoplasmas nach osmotischer Schockbehandlung angewendet.

Das aus Kap. 4.5.1.1 resultierende Zellpellet wurde in 275 µL PBS-Puffer (pH 7,2, 10 % (v/v) Detergenzienlösung BugBuster, 0,1 % (v/v) Benzonase, 27,5 U Lysozym) resuspendiert, 20 min leicht rotiert und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 25 min, 4 °C). Der Zentrifugationsüberstand wurde vom Zellpellet getrennt und bildete die lösliche cytoplasmatische Proteinfraction. Das Zellpellet wurde wieder in 275 µL PBS-Puffer (pH 7,2, 10 % (v/v) Detergenzienlösung BugBuster, 27,5 U Lysozym) aufgenommen und nach 5 min Inkubation unter leichtem Rotieren mit 1,65 mL PBS-Puffer (pH 7,2, 1 % (v/v) Detergenzienlösung BugBuster) aufgefüllt und 1 min gemischt. Nach der Zentrifugation (5000 rpm, 15 min, 4 °C) der Probe wurde das Zellpellet nochmals zweimal mit 800 µL PBS-Puffer (pH 7,2, 1 % (v/v) Detergenzienlösung BugBuster) gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das resultierende Pellet in 275 µL 1 % (w/v) SDS-Lösung resuspendiert und bildete die unlösliche cytoplasmatische Proteinfraction. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur (20-25 °C) durchgeführt. Beide Proteinfractionen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

4.5.1.3 Ultraschall

75 mg Zellmaterial wurden in 2 mL eiskaltem PBS-Puffer (Tab. 4-6) resuspendiert und anschließend in drei aufeinanderfolgenden Intervallen für je 30 s mit jeweils 2 min Pause mit Ultraschall aufgeschlossen (Sonopuls HD 2070, Sonotrode UW 2070, Bandelin Elektronik, Deutschland). Die Zellsuspension wurde dabei ständig im Wasserbad bei 4 °C gekühlt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (13000 rpm, 25 min, 4 °C) in der Kühltischzentrifuge von der löslichen Proteinfraction getrennt oder direkt einer Hitzebehandlung (Kap. 4.5.2) unterzogen.

4.5.2 Hitzebehandlung

Das Zelllysate aus dem Ultraschallaufschluss (Kap. 4.5.1.3) wurde für 10 min bei 55 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Die Abtrennung der Zelltrümmer und der hitzedenaturierten Proteine von der gelösten Proteinfraction erfolgte mittels Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 25 min.

4.5.3 Chromatographie

Sämtliche chromatographischen Reinigungsschritte wurden mit einem FPLC-System der Firma Pharmacia, Schweden (Modell LCC 500 Plus) mit zwei Pumpen (Modell P-500), einem Fraktionssammler (Modell Frac-100), einem Leitfähigkeitsdetektor und einem UV-Detektor (Modell LKB 2510, Uvicord SB, LKB Bromma, Schweden) durchgeführt. Mit der Software „FPLC-Manager“ (Pharmacia, Schweden) wurde die FPLC-Anlage angesteuert und die Daten erfasst. Das Probenmaterial wurde je nach Volumenumfang über einen Säulenloop (50 mL Fassungsvermögen, Amersham Biotech, Schweden) oder manuell mit einer Spritze injiziert. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur von 20-25 °C durchgeführt.

Die Pufferlösungen wurden im Vorfeld mikrofiltriert (Sterivex-GP, 0,22 µm, Millipore, Deutschland) und anschließend mittels einer Vakuumpumpe 15 min entgast, wobei das Gefäß mit der Pufferlösung im Ultraschallbad stand, um das Entweichen der Gase zu beschleunigen. Die Mikrofiltration des Probenmaterials erfolgte über einen Sterilfilter der Fa. Sartorius, Deutschland (MiniSart HighFlow, cut off: 0,2 µm).

4.5.3.1 Metall-Chelat-Chromatographie

Die Aufreinigung der rekombinanten TfH mit dem C-terminalen His₆-Tag aus dem Kulturmedium und der periplasmatischen Proteinfraction (Kap. 4.5.1.1) erfolgte zunächst im Batch-Verfahren. Wenn nicht anders erwähnt, wurde im 1L Maßstab gearbeitet. Ni²⁺-Chelat-Sephrose (Chelating SepharoseTM, Amersham Biosciences, Schweden) wurde nach Herstellerangaben mit Ni²⁺-Ionen beladen. Für 400 U rTfH-Aktivität wurde 1 mL aktivierte Ni²⁺-Chelat-Sephrose-Suspension in die mikrofiltrierte Proteinlösung (MiniSart HighFlow, 0,2 µm) gegeben und anschließend für 30 bis 60 min bei leichten Rühren inkubiert. Dabei wurde in regelmäßigen Abständen das Rühren kurzzeitig unterbrochen und nach Absinken des Chromatographiematerials eine Probe entnommen, um die verbliebene rTfH-Aktivität (<3 % der Gesamtaktivität im Überstand) im Überstand überprüfen. Blieb diese unverändert wurde die Suspension in eine Chromatographiesäule (XK 26/60, Amersham Biosciences) gefüllt, wobei an den Säulenausgang eine Peristaltikpumpe angeschlossen wurde, um den Durchfluss sowie das Absetzen des Chromatographiematerials zu beschleunigen. Anschließend wurde die Chromatographiesäule verschlossen und an das FPLC-System angeschlossen. Das Säulenmaterial wurde dann mit drei Säulenvolumen Waschpuffer (Tab. 4-8) gewaschen, um Proteinverunreinigungen zu entfernen. rTfH wurde mittels eines linearen Imidazolgradienten eluiert. Dabei wurde zum Waschpuffer der Elutionspuffer (Tab. 5-9) so zugefügt, dass die Imidazolkonzentration von 10 mM bis 500 mM in drei Säulenvolumen erreicht wurde.

Tab. 4-8: Waschpuffer für die Metall-Chelat-Chromatographie

Tris-HCl	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	10 mM

Die Pufferbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst und die Pufferlösung wurde auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Tab. 4-9: Elutionspuffer für die Metall-Chelat-Chromatographie

Tris-HCl	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM

Die Pufferbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst und die Pufferlösung wurde auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

4.5.3.2 Gelfiltration

Die Gelfiltration schloss sich der Metall-Chelat-Chromatographie an. Je nach Bedarf wurden die Probenvolumina mittels Ultrafiltration auf ein Probenvolumen von 2 bis 10 mL (Amicon stirred cell 1050 oder 1010, Millipore, USA) eingengt. Die Chromatographiesäule (HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade) wurde mit 3 Säulenvolumina bei einer Flussrate von 2,5 mL min⁻¹ mit 0,9 % NaCl-Lösung equilibriert. Nach der Injektion der Probe erfolgte die Proteinelution mit 0,9 % NaCl-Lösung bei einer Flussrate von 2 mL min⁻¹.

4.6 Analytik

4.6.1 Biomasse und optische Dichte

Die optische Dichte wurde in einer geeigneten Verdünnung im Spektralphotometer (Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, Schweden) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Proben wurden mit milliQ-H₂O verdünnt. Die Extinktion verdünnter Proben wurde mittels Dreifachbestimmung ermittelt.

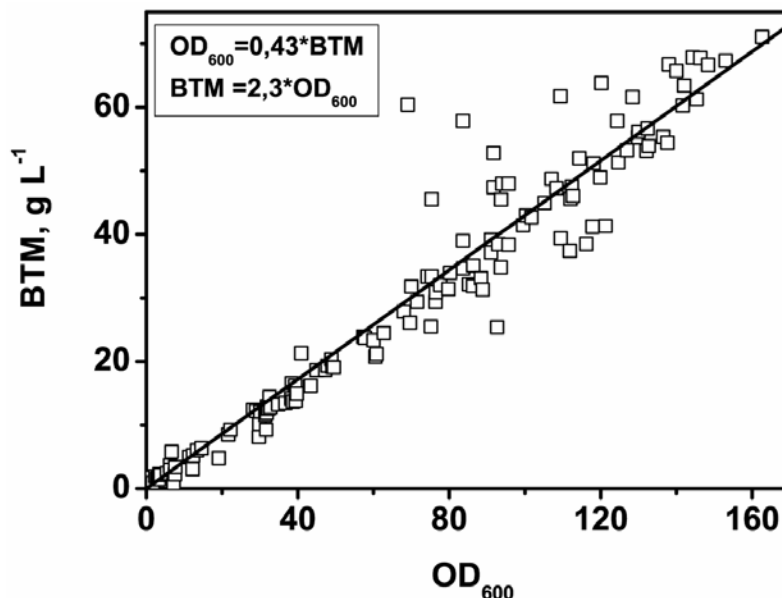


Abb. 4-3: Zusammenhang zwischen der optischen Dichte (OD₆₀₀) und der Biotrockenmasse (BTM) bei *E. coli* TG1: pCytexP1-*OmpA-bta1*-His₆ über den gesamten Kultivierungsbereich.

Zur Bestimmung der Biotrockentrockenmasse wurden dreimal 1 mL Probe in vorgetrocknete und ausgewogenen Eppendorfgläser 5 min bei 4 °C und 13000 rpm in einer Kühltischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit milliQ-H₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und die Pellets im Vakuumschrank bei 45 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Abb. 4-3 stellt die Korrelation zwischen der Optischen Dichte und der Biotrockenmasse aus sechs Hochzelldichtekultivierungen dar.

4.6.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Bestimmung der im Kulturüberstand enthaltenen Metabolite erfolgte als Einfachbestimmung mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Verwendet wurde dazu eine Anlage der Firma Shimadzu der Reihe SCL-10A mit den Komponenten Pumpensystem (LC-10AT), Säulenofen (CTO 10AC), Injektor (SIL 10 A), UV-Detektor (SPD-10A), Refraktionsindex (RI)-Detektor (RID-10A) und Membrandegasser (DGU-14A).

Die verwendete HPLC wurde mit einer Aminex HPX87-H Ionenaustauschersäule (300 x 7,8 mm) und einer MicroguardCation H Cartridge Vorsäule (beide BioRad Laboratories, USA) bei 60 °C betrieben. Als Laufmittel diente 5 mM Schwefelsäure mit einer Flussrate von 0,6 mL min⁻¹. Es wurden jeweils 10 µL Probe eingespritzt und die Laufzeit einer Messung betrug 30 min. Die Erfassung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software LC Solution (Shimadzu, Japan).

Die Zuordnung der Peakflächen zu den korrespondierenden Konzentrationen der Komponenten erfolgte über einen HPLC Standard aus Glukose, Pyruvat, Succinat, Propionat, Formiat, Acetat und Isobutyrat, der entsprechend verdünnt in den Komponentenkonzentrationen 25 mM, 50 mM und 100 mM mit den Proben vermessen wurde. Zur Qualitätskontrolle waren 10 % der vermessenen Proben ebenfalls Standards.

Vor der Integration der erfassten Peaks erfolgte, wenn nötig, eine manuelle Anpassung der Basislinie sowie der Peakgrenzen. Wurde die Basislinie zwischen zwei benachbarten Peaks nicht wieder erreicht, so wurde am tiefsten Punkt der Linie manuell eine senkrechte Trennung in zwei Flächen vorgenommen.

Für die Bestimmung der Metabolitzusammensetzung in den Kulturproben wurde eine 2 mL Probe 5 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgeläß überführt und für 5 min zur Proteindenaturierung im Thermoblock bei 80 °C inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert. Der erneut dekantierte Überstand wurde durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einem cut-off von 0,45 µm (Minisart RC15, Sartorius, Deutschland) in Rollrandgläschen filtriert, die anschließend mit Alukappen mit Septum versiegelt wurden. Danach wurden diese bei -20 °C zur späteren Analyse eingefroren.

4.6.3 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe wurden elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt. 0,7-1% (w/v) Agarose wurde in 100 mL TAE-Puffer (Tab. 4-10) bis zum Kochen erhitzt und nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C mit 5 µL Ethidiumbromid versetzt. Die Agaroselösung wurde in eine entsprechende Gelform gegossen und polymerisierte mindestens 30 min bei Raumtemperatur (20-25 °C). Anschließend wurde das erstarrte Gel in die Elektrophoresekammer überführt. Die DNA-Proben wurden gegebenenfalls mit milliQ-H₂O verdünnt, dann mit 10 % (v/v) DNA-Probenpuffer (Tab. 4-11) vermischt und in die vorgeformten Geltaschen pipettiert. Parallel dazu wurde der DNA-Marker „Gene Ruler DNA ladder mix“ (Fermentas, Deutschland) zum Größenvergleich mit aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 60-70 V für 1-1,5 h. Die DNA-Banden wurden durch das interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Belichtung ($\lambda=266$ nm) mit einer Chemidoc-Anlage (Biorad) sichtbar gemacht und dokumentiert.

Tab. 4-10: TAE-Puffer

Trisma base	40 mM
Eisessig	20 mM
EDTA	1 mM

Die Pufferbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst.

Tab. 4-11: DNA-Probenpuffer

Glycerin	40 % (v/v)
EDTA	0,1 M
SDS	0,1 % (v/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)

Die Pufferbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst.

4.6.4 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation der *E. coli* Zellen erfolgte nach einem Protokoll von Dower et al. [1988].

4.6.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden 500 mL LB-Medium (2 L Erlenmeyerkolben) mit 1% (v/v) Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,5-1 auf dem Schüttler kultiviert. Die Zellen wurden für 15-30 min auf Eis gekühlt und dann mittels Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 4°C) vom Kulturmedium getrennt. Die Zellen wurden dreimal in 250 mL sterilfiltriertem HEPES-Puffer (1 mM, pH 7,0) und dann ein weiteres Mal in 10 mL 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen und anschließend zentrifugiert (6000 rpm, 10 min, 4°C). Abschließend wurden die *E. coli* Zellen in 625 µL 10 %igem (v/v) Glycerin aufgenommen und direkt für die Transformation eingesetzt oder in Aliquots zu je 40 µL in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Sämtliche Schritte wurden bei 4 °C und unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

4.6.4.2 Elektroporation von *E. coli* Zellen

40 µL auf Eis getaute kompetente *E. coli* Zellen und 0,25-1 µg DNA (in maximal 2 µL) wurden in eine eiskalte Transformationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt und im GenePulser™ der Firma Biorad (1,5 kC, 400 Ω, 25 µF) transformiert. Die Zellen wurden anschließend sofort mit 1 mL Elektroporationsmedium (Tab. 4-12) vermischt und für 2 h bei 30 °C und 225 rpm inkubiert. Von den Ansätzen wurden 100 bis 200 µL auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

Tab. 4-12: Elektroporationsmedium für die Transformation von *E. coli*

MgSO ₄	10 mM
Glukose	0,4 % (w/v)
Bacto-Trypton (Ref. 211705)	10 g L ⁻¹
Bacto-Hefe-Extrakt (Ref. 212750)	5 g L ⁻¹
NaCl	5 g L ⁻¹

Die Medienbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst und die Pufferlösung wurde auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt.

4.6.5 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen nach Laemmli [1970] durchgeführt. Die Proteine wurde mit Hilfe der Apparatur „Mini Protean II“ der Firma Biorad Laboratories (USA) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben aufgetrennt. In Tab. 4-13 bis Tab. 4-15 sind die für die SDS-Gelelektrophorese verwendeten Lösungen aufgeführt. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (Tab. 4-16) in einem Verhältnis von 1 zu 2 gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Als Größenstandard wurde der „High Precision Plus Protein™ Standard“ (Biorad) benutzt.

Tab. 4-13: Trenngel (12 %ig, w/v) für 2 SDS-Gele

Acrylamid / Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	6 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,8 mL
10 % SDS	150 µL
milliQ-H ₂ O	6,2 mL
TEMED	20 µL
40 % APS	30 µL

Tab. 4-14: Sammelgel (5 %ig, w/v) für 2 SDS-Gele

Acrylamid / Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	0,75 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 mL
10 % SDS	50 µL
milliQ-H ₂ O	2,95 mL
TEMED	15 µL
40 % APS	15 µL

Tab. 4-15: Elektrodenpuffer

Tris-HCl	30 g L ⁻¹
Glycin	144 g L ⁻¹
SDS	10 g L ⁻¹

Die Pufferbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst.

Tab. 4-16: SDS-Probenpuffer

Tris-HCl (pH 6,8)	125	mM
SDS	4	% (w/v)
Glycerin	10	% (v/v)
β -Mercaptoethanol	4	% (v/v)
Bromphenolblau	0,02	% (w/v)

Die Pufferbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst für ca. 10 min bei 120 V (bis zum Erreichen der Trenngelfront) und dann für ca. 1 h bei 160 V. Die SDS-Gele wurden anschließend für 2 h in Färbelösung (Tab. 4-17) geschwenkt und dann so lange entfärbt (Tab. 4-18) bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Zur Aufbewahrung wurden die Gele zwischen zwei Cellophan-Schichten getrocknet.

Tab. 4-17: Färbelösung

Essigsäure	10	% (w/v)
Ethanol	50	% (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,2	% (w/v)

Die Färbelösung wurde mit milliQ-H₂O angesetzt.

Tab. 4-18: Entfärbelösung

Essigsäure	10	% (w/v)
Ethanol	50	% (v/v)

Die Entfärbelösung wurde mit milliQ-H₂O angesetzt.

Als alternative Färbemethode wurde gegebenenfalls auf die Silberfärbung zurückgegriffen. Dabei kam das Protokoll nach Heukeshoven und Dernick [1988] zum Einsatz. Die einzelnen Färbeschritte und die notwendigen Lösungen sind im Folgenden aufgeführt (Tab. 4-19). Während der Silberfärbung wurde das SDS-Gel bei Raumtemperatur (20-25 °C) in einem passenden Gefäß in der jeweiligen Lösung geschwenkt.

Tab. 4-19: Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick [1988].

Färbeschritte	Inkubationszeit pro Färbeschritt	Färbeschritte	Inkubationszeit pro Färbeschritt
1-2 Fixierer I (Tab. 4-20)	4 min	10 Entwicklung (Tab. 4-23)	0,5 min
3 Fixierer II (Tab. 4-21)	8 min	11 Entwicklung (Tab. 4-23)	2-6 min
4-6 milliQ-H ₂ O	3 min	12 5 % Eisessig	2 min
7-8 milliQ-H ₂ O	4 min	13 milliQ-H ₂ O	3 min
9 Färbelösung (Tab. 4-22)	10 min		

Tab. 4-20: Fixierer I für Silberfärbung

Ethanol	30 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)

Die Fixierlösung wurde mit milliQ-H₂O angesetzt.

Tab. 4-21: Fixierer II für Silberfärbung

Natriumacetat	0,4 M
Ethanol	30 % (v/v)
Natriumthiosulfat	0,1 % (w/v)
Glutaraldehyd	0,5 % (v/v)

Die Fixierlösung wird mit milliQ-H₂O angesetzt.

Tab. 4-22: Färbelösung für Silberfärbung

Silbernitrat	0,1 % (w/v)
Formaldehyd	0,025 % (v/v)

Die Färbelösung wurde mit milliQ-H₂O angesetzt.

Tab. 4-23: Entwickler für Silberfärbung

Natriumcarbonat	2,5 % (w/v)
Formaldehyd	0,04 % (v/v)

Der Entwickler wurde mit milliQ-H₂O angesetzt.

4.6.6 Transfer der Proteine vom SDS-Gel

Die Proteine, die mittels der SDS-Gelelektrophorese getrennt und über N-terminale Aminosäuresequenzierung identifiziert werden sollten, mussten zuvor auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Sequi-Blot™ PVDF-Membran, BioRad Laboratories, USA) geblottet werden. Die PVDF-Membran wurde kurz mit Methanol gespült, für 5 min in milliQ-H₂O und dann zusammen mit dem Filterpapier für 20 min in eiskaltem Transfer-Puffer (Tab. 4-24) geschwenkt. Der Aufbau des Blotting-Sandwiches erfolgte nach den Herstellerangaben der Blottingapparatur (Semiphor™ Semi-Dry Transfer Unit, Hoefer® TE 70 Series, Amersham Pharmacia Biotech). Das SDS-Gel wurde vor dem Auflegen auf die PVDF-Membran 10 min in Transfer-Puffer inkubiert. Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel in die PVDF-Membran erfolgte für 30 min bei 12 V. Die PVDF-Membran wurde nach dem Transfer kurz mit Methanol gespült, 5 min gefärbt (Tab. 4-25) und abschließend mit 50 % (v/v) Methanol so lange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Nach dem Trocknen der PVDF-Membran an der Luft wurden die Proteinbanden von Interesse mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten und zur N-terminalen Aminosäuresequenzierung (Kap. 4.6.7) gegeben.

Tab. 4-24: Transfer-Puffer für Protein-Blotting

Tris-HCl	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	15 % (v/v)

Die Pufferbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst.

Tab. 4-25: Färbelösung für Protein-Blotting

Essigsäure	1 % (v/v)
Methanol	40 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 % (w/v)

Die Pufferbestandteile wurden in milliQ-H₂O gelöst.

4.6.7 N-terminale Aminosäuresequenzierung

Die Identifizierung der N-terminalen Aminosäuresequenz erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Rita Getzlaff (Abt. Strukturbiologie, HZI Braunschweig) am ABI 494A Procise HAT Sequencer (Applied Biosystems, USA). Dazu wurden Blottingproben (Kap. 4.6.6) verwendet.

4.6.8 Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der rekombinanten TfH und der PsL erfolgte mit Hilfe der Multiphor II-Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben. Dazu wurde ein zuvor halbiertes „Ampholine® PAGplate“-Gel mit einem pH-Gradienten von 3,5-9,5 verwendet (GE Healthcare, England). Als Anoden- und Katodenlösung wurden 1 M Phosphorsäure bzw. 1 M Natronlauge eingesetzt. Der isoelektrische Punkt eines Enzyms wurde in einer Dreifachbestimmung ermittelt. Dabei wurden 10 µL Proteinlösung mit einer Proteinkonzentration von ca. 10 µg mL⁻¹ jeweils auf drei kleine Filterplättchen pipettiert, die in den einzelnen Gel-Spuren mit 2 cm, 5 cm und 7 cm Abstand zur Katode im pH-Gradienten-Gel positioniert waren. So konnte ein mögliches Ausfallen eines Proteins bei einem spezifischen pH-Wert festgestellt werden. Zusätzlich zu den Proteinproben wurde der pI-Standard („broad pI calibration kit“ pH 3,0-10,0, GE Healthcare, England) aufgetragen. Die Fokussierung für ein halbes pH-Gradienten-Gel erfolgte bei 10 °C, 1500 V unter Begrenzung der Stromstärke auf 25 mA über 1,5 h. Die Proteinbanden wurden durch eine Silberfärbung (Kap. 4.6.5) sichtbar gemacht.

4.6.9 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration einer Proteinlösung wurde mittels dem Bradford-Protein-Assay bestimmt [Bradford 1976, Zor und Selinger 1996]. Dazu wurde der Protein-Assay Roti®-Nanoquant der Firma Roth, Deutschland benutzt. Die Proteinkonzentration konnte aus einem Vergleich mit einer Eichgerade, bei der Bovines Serumalbumin (BSA) als Standardprotein eingesetzt worden war, ermittelt werden.

4.7 Polyesteranalytik

4.7.1 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Molekulargewichtsverteilung der Polyester sowie der Polyesterspaltprodukte (nach enzymatischer Hydrolyse der Polyester) wurde mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie (GPC) ermittelt. Die GPC-Anlage wurde mit einer Pumpe (Gynkotek 300 C, Gynkotek, Deutschland), einem Refraktionsindex (RI)-Detektor (Shodex RI-71, Techlab, Deutschland), einer Vorsäule (PLgel®, 5 µm Guard, 50 x 7,5 mm, Polymer Laboratories, USA) und einer Trennsäule (PLgel®, 5 µm, 10⁴ Å, 300 x 7,5 mm, Polymer Laboratories, USA) betrieben. Die Auftrennung der Proben erfolgte mit der Flussrate von 1 mL min⁻¹ mit Chloroform als mobile Phase bei einer Raumtemperatur von 20-25 °C. Das Probenvolumen betrug 50 µL. Bezüglich

der Molekulargewichtsverteilung der Polyester betrug die Polyesterkonzentration in den Proben 1 mg mL^{-1} und hinsichtlich der Molekulargewichtsverteilung der Polyesterspaltprodukte variierte diese zwischen 1 mg mL^{-1} und 5 mg mL^{-1} . Vor der Injektion wurden die Proben mikrofiltriert (Zellulosenitratfilter, $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, Sartorius AG, Deutschland). Die Kalibrierung der Chromatographiesäule erfolgte mit Polystyrol („low molecular weight calibration“ Kit, Polymer Laboratories USA).

4.7.2 Differentialkalorimetrie (DSC)

Der Polyesterschmelzpunkt (T_m) sowie die Schmelzenthalpie (ΔH_m), die sich aus der Fläche unter dem Schmelzpeak ergibt, wurden mit Hilfe der Differentialkalorimetrie bestimmt (Mettler DSC 12 E mit Mettler Toledo Software TA 89 E, Mettler Toledo, Schweiz). Für die Messungen wurde eine Heizrate von $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ und eine Polyestermenge von 5 mg bis 10 mg angesetzt. Die Messungen erfolgten unter Stickstoffatmosphäre.

4.7.3 Bestimmung von Partikelgrößen

Die Bestimmung der mittleren Partikelgröße erfolgte mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung. In Bezug auf die Polyesternanopartikel wurde ein Zetasizer 3 der Firma Malvern (England) verwendet. Der Zetasizer 3 deckte Partikelgrößen mit einem Durchmesser von 5 nm bis $5 \text{ }\mu\text{m}$ ab. Für die Poly(3-Hydroxybutyrat)-Granula wurde das Laserbeugungsspektrometer Helos benutzt (H1873, Küvette R2, Sympatec GmbH, Deutschland), welches Partikelgrößen in einer Dimension von $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ bis $87,5 \text{ }\mu\text{m}$ erfasste. Beide Geräte wurden mit einem 5 mW Helium-Neon-Laser bei einem Streuwinkel von 90° betrieben.

4.7.4 Herstellung von Polyesterfilmen

Die Polyesterfilme wurden im Schmelzpressverfahren hergestellt. Die verwendete Schmelzpresse bestand aus einer hydraulischen Presse, einer Temperaturkontrolleinheit (beide Perkin-Elmer), zwei thermostatisierbaren Metallplatten und Distanzringen (PIN 15515 Specac, England), welche die Polyesterfilmdicke festlegten. Vor dem eigentlichen Schmelzpressvorgang wurden Polyesterrohlinge angefertigt. Dazu wurde Polyestermaterial zwischen Silikon beschichtetem Papier gelegt, bei einer Schmelztemperatur, welche ca. $5 \text{ }^\circ\text{C}$

unterhalb der Polyesterschmelztemperatur lag, für 5 min geschmolzen und dann bei einem Druck von ca. 15 bar für 2 min gepresst. Aus diesem Polyesterfilm wurden die Polyesterrohlinge mit einem Durchmesser von 40 mm mit einem Stanzeisen gestanzt. Anschließend wurden die Polyesterrohlinge mit silikonisiertem Papier auf beiden Seiten in die Distanzringe gewünschter Dicke gelegt, geschmolzen (5 °C unterhalb der Schmelztemperatur) und bei 25 bar Druck 2 min gepresst. Polyesterfilme definierter Größe (\varnothing 12 mm bzw. 5 mm) wurden mit dem Stanzeisen ausgestanzt. Die Filmdicke betrug $170 \pm 50 \mu\text{m}$.

4.7.5 Herstellung von dP(3HB)-Granulasuspensionen

20 mg Poly(3-Hydroxybutyrat) dP(3HB)-Granula (ICI, England) wurden in 10 mL milliQ-H₂O oder in NaCl-Lösung (0,01 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,9 % (w/v)) aufgenommen und 10 min mit Ultraschall (Sonopuls HD 2070, Sonotrode UW 2070, Bandelin Elektronik, Deutschland) behandelt. Um eine Wärmeentwicklung zu vermeiden, wurde die Suspension im Eiswasserbad gekühlt. Zur Bestimmung der dP(3HB)-Konzentration in der wässrigen Suspension wurde viermal 1 mL Probenvolumen in abgewogenen Schälchen über 24 h bei 40 °C eingetrocknet und anschließend auf einer Analysenwaage gewogen.

4.7.6 Herstellung von Polyesternanopartikeln

Die Polyesternanopartikel wurden mittels der Präzipitationsmethode hergestellt. Das Polyestermaterial wurde in einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöst (Polyestermengen und Lösungsmittelvolumen siehe Tab. 4-26) und anschließend unter starkem Rühren (Ultraturrax bei 8000 rpm, TP 25, Jahnke & Kunkel, IKA-Werk, Deutschland) tröpfchenweise in 100 mL milliQ-H₂O pipettiert. Dabei stand das Gefäß mit dem milliQ-H₂O in einem Eiswasserbad. Die Polyestersuspension wurde durch eine Filtrationsnutsche mit einer Porengröße von 2 μm filtriert. Das organische Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer entfernt.

Zur Bestimmung der Polyesternanopartikelkonzentration in der wässrigen Suspension wurden viermal 2 mL Suspension in abgewogenen Schälchen über 24 h bei 40 °C eingetrocknet und anschließend auf einer Analysenwaage gewogen.

Tab. 4-26: Polyestermaterialien und die zur Herstellung der Nanopartikelsuspensionen nötigen organischen Lösungsmittel

Polyestermaterial	Polyestermenge, mg	Lösungsmittel	Lösungsmittelvolumen, mL
PET	100	HFIP	10
SP 4/6	200	Aceton	10
PCL	100	Aceton	10
dP(3HB)	30	in 5 mL Trifluorethanol gelöst und mit Ethanol auf 8 mL aufgefüllt	

4.8 Enzymanalytik

4.8.1 Enzyme

In Tab. 4-27 sind die Enzyme, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, aufgelistet. wTfH, PsL und CcL lagen in Pulverform vor. Definierte Festpulvermengen wurden in autoklavierter 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst. Von jeder neu angesetzten Stammlösung wurde die Proteinkonzentration (Kap. 4.6.9) bestimmt. Aufgrund von Messungenauigkeiten schwankte die Proteinkonzentration um $\pm 10\%$.

Tab. 4-27: Herkunft der Enzyme und Lösungsmittel

Enzym	Abkürzung	Lösungsmittel	Stammlösung mg _{Feststoff} mL ⁻¹	Stammlösung mg _{Protein} mL ⁻¹	Bezugsquelle
Hydrolase aus <i>Thermobifida fusca</i>	wTfH	0,9 % NaCl	20	2 \pm 0,2	Gouda et al. [2002]
in <i>E. coli</i> rekombinant synthetisierte Hydrolase	rTfH	0,9 % NaCl	—	1,42	diese Arbeit
Lipase aus <i>Pseudomonas spec.</i>	PsL	0,9 % NaCl	4 / 0,4	1,2 \pm 0,1 ¹ / 0,11 \pm 0,01 ¹	Sigma, Deutschland
dP(3HB)-Depolymerase aus <i>Paucimonas lemoignei</i>	PhaZ5	10 mM Tris-HCl, pH 7,4	—	2,2	Jendrossek et al. [1995]
Lipase aus <i>Candida cylindracea</i>	CcL	0,9 % NaCl	4	0,6 \pm 0,06	Fluka, Deutschland

¹Angebene Proteinkonzentration bezieht sich auf den Gehalt an aktivem Enzym in der PsL-Enzymformulierung (vgl. Kap. 5.2.1).

rTfH und PhaZ5 lagen in gelöster Form vor. Für die Enzymtests wurde nur hoch aufgereinigte rTfH mit einer spezifischen Aktivität von $445 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ mL}^{-1}$ verwendet (Kap. 5.1.3.2). PhaZ5 wurde aus dem Labor von Dieter Jendrossek zur Verfügung gestellt.

Die Stammlösungen wurden je nach Bedarf zu je 50-300 μL Enzymlösung aliquotiert und konnten bei -20°C für maximal 2 Monate (rTfH: mindestens 6 Monate) bei -20°C gelagert werden. Für die Enzymtests wurde nur Enzymlösung verwendet, welche mindestens 12 h eingefroren war. Aufgetaute Enzymlösung wurde verworfen.

4.8.2 Substrate

Im Folgenden sind die Substrate aufgelistet, die in dieser Arbeit zur Charakterisierung der Enzyme verwendet wurden.

4.8.2.1 Polyester

Die Nomenklatur der linearen, aliphatischen Polyester (Abb. 4-4) erfolgt nach der Vorschrift des Deutschen Institutes für Normung DIN 7728. So wird bei den gesättigten Polyestern, welche aus dem Diol und der Dicarbonsäure bestehen, nach der Abkürzung SP (saturated polyester) zuerst die Anzahl der Kohlenstoffatome des Diols und dann die Anzahl der Kohlenstoffatome der Dicarbonsäure als Zahlenwert, wie in folgenden Beispielen (Tab. 4-28) gezeigt, angegeben.

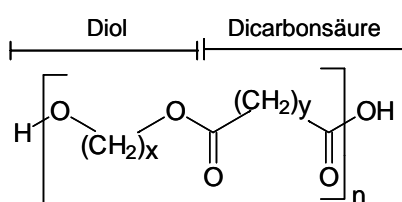


Abb. 4-4: Strukturformel der gesättigten, linearen, aliphatischen Polyester.

Tab. 4-28: 10: Beispiel für die Nomenklatur gesättigter, linearer, aliphatischer Polyester.

Monomere Diol/ Dicarbonsäure	Strukturbezogener Name nach IUPAC ^{a)}	Kurzform nach DIN 7728
1,4-Butandiol / Adipinsäure	Poly-(tetramethylenadipat)	SP 4/6
1,4 Butandiol / Dodecandisäure	Poly-(tetramethyldodecanoat)	SP 4/12

^{a)} IUPAC= International Union of Pure and Appplied Chemistry

Für die Benennung der aliphatisch-aromatischen Copolyester (Abb. 4-5) werden anstelle der IUPAC-Namen ebenfalls Kurzformen verwendet. Demnach werden die Anfangsbuchstaben der im Copolyester enthaltenen Monomere benutzt, wobei der erste Buchstabe sich auf das Diol (z.B. 1,4-Butandiol=B), der zweite Buchstabe auf die aromatische Disäure (Terephthalsäure=T) und der dritte Buchstabe auf die aliphatische Disäure (Adipinsäure=A) bezieht. Hinter der Abkürzung werden, durch einen Schrägstrich getrennt, die prozentualen stöchiometrischen Anteile (in mol %) der aromatischen und aliphatischen Repetiereinheit angegeben.

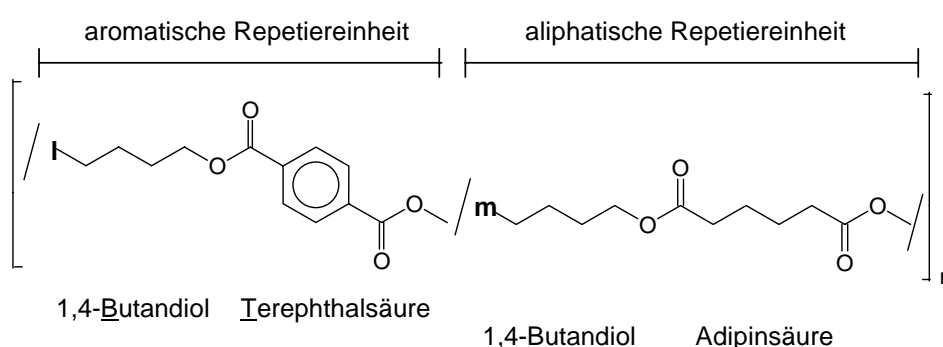


Abb. 4-5: Strukturformel von aliphatisch-aromatischen Copolyestern mit einer statistischen Anordnung.

Die Variablen l und m geben den prozentualen stöchiometrischen Anteil der aromatischen bzw. aliphatischen Repetiereinheit an.

Bezüglich des aromatischen Polyesters Poly(ethylterephthalat) wurde die handelsübliche Abkürzung „PET“ gewählt.

Die verwendeten Polyester stammen aus Synthesen von Witt [1996] und Marten [2000] (Tab. 4-29). Die Synthese der Polyester (Bezugsquelle: GBF, Deutschland) erfolgte durch Polykondensation in der Schmelze nach Witt et al. [1994]. Die anderen Polyester wurden bei den in der Tab. 4-29 genannten Bezugsquellen erworben. Die relativen Molekulargewichte sowie das thermische Verhalten wurden mittels GPC (Kap. 4.7.1) bzw. mittels Differentialkalorimetrie (Kap. 4.7.2) bestimmt. Die Polyester wurden entweder für die Präparation von Filmen (Kap. 4.7.4) oder Nanopartikeln (Kap. 4.7.6) benutzt. Im Falle des dP(3HB)s wurden diese unter anderem auch für die Herstellung der Granulasuspensionen verwendet (Kap. 4.7.5)

Tab. 4-29: Physikalische Eigenschaften der Polyester

Polyester	M_w , g mol^{-1}	M_n , g mol^{-1}	T_m , $^{\circ}\text{C}$	ΔH_m , J g^{-1}	Bezugsquelle
SP 4/4	75500	37100	118	73	GBF, Deutschland
SP 4/6	61700	28900	59	60	GBF, Deutschland
SP 4/8	34100	16900	62	112	GBF, Deutschland
SP 4/10	34415	17154	69	118	GBF, Deutschland
SP 4/12	25581	9989	79	92	GBF, Deutschland
PCL ¹	50000	n.b.	60	n.b.	Polysciences, Deutschland
dP(3HB)	54000	n.b.	180	n.b.	ICI, England
BTA 10/90	21400	8750	54	77	GBF, Deutschland
BTA 20/80	23900	8330	54	62	GBF, Deutschland
BTA 32/68	29400	6750	85	12	GBF, Deutschland
BTA 40/60	36100	13600	107	13	Hüls AG, Deutschland
BTA 50/50	21200	6390	144	20	GBF, Deutschland
BTA 60/40	21900	9080	152	27	Hüls AG, Deutschland
PBT	n.b.	n.b.	224	43	BASF, Deutschland
PET	n.b.	n.b.	257	44	BASF, Deutschland

n.b.: nicht bestimmt; ¹Daten aus Welzel [2003]

Polyesterfilme

Die Polyesterfilme wurden im Schmelzpressverfahren hergestellt (Kap. 4.7.4). Die verfügbare Oberfläche eines Polyesterfilms mit einem Durchmesser von 12 mm und einer Dicke von 170 μm betrug 2,33 cm^2 (vgl. Anhang).

Polyesternanopartikel

Die Polyesterkonzentrationen in den verwendeten Nanopartikelsuspensionen und der jeweilige Partikeldurchmesser sind in der Tab. 4-30 gegeben. Die Nanopartikel wurden mit Hilfe der Präzipitationsmethode hergestellt (Kap. 4.7.6) und der Durchmesser der Polyesternanopartikel mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelt (Kap. 4.7.3).

Die Abschätzung der enzymverfügbaren Polyesteroberfläche (A , cm^2) ergibt sich aus der eingesetzten Polyester Menge (m , g), der Dichte des Polyesters (ρ_p , g cm^{-3}) und des Partikeldurchmessers (d_p , cm) (Kap. 0).

$$A = \frac{m}{\rho_p} \cdot \frac{6}{d_p} \quad \text{Gleichung 4-12}$$

Tab. 4-30: Polyesterkonzentration in den Nanopartikelsuspensionen und der Partikeldurchmesser der Nanopartikel.

Polyester	Polyesterkonzentration, mg mL^{-1}	Nanopartikeldurchmesser p_d , nm	Dichte ρ , g cm^{-3}
SP 4/4	$3,2 \pm 0,2$	151 ± 3	1,3
PCL	$1,4 \pm 0,2$	150 ± 4	1,3
dP(3HB)	$0,825 \pm 0,1$	95 ± 5	1,2
PET	$1,4 \pm 0,2$	92 ± 5	1,3

dP(3HB)-Granula

Die dP(3HB)-Konzentration in der dP(3HB)-Granulasuspension und der Partikeldurchmesser (Kap. 4.7.3) betrugen $2 \pm 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ bzw. $1,39 \pm 0,3 \text{ }\mu\text{m}$.

4.8.2.2 BT und BTB

Die Herstellung der löslichen aromatischen Ester 4-Hydroxybutylterephthalsäuremonoester (BT) und Di-4-Hydroxybutylterephthalsäurediester (BTB) (Abb. 4-6) erfolgte nach einem Verfahren von Witt [1996].

Die Substrate BT und BTB stammten aus Synthesen von Marten [2000]. Das Molekulargewicht und die thermischen Eigenschaften beider Ester sind in Abb. 4-6 dargestellt. BT und BTB wurden in einer Konzentration von $0,37 \text{ mg mL}^{-1}$ bzw. von $0,23 \text{ mg mL}^{-1}$ in millQ- H_2O gelöst.

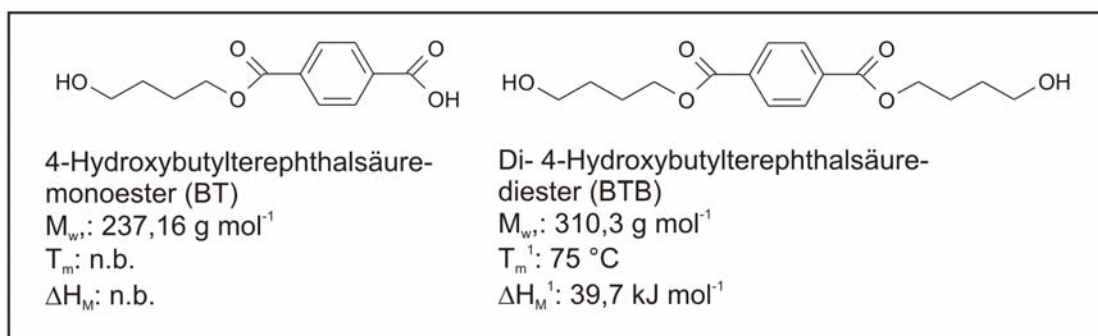


Abb. 4-6: Physikalische Eigenschaften der wasserlöslichen aromatischen Ester BT und BTB. ¹Daten wurden aus Marten [2000] entnommen.

4.8.2.3 Triglyceride und *p*-Nitrophenylester

Die in dieser Arbeit verwendeten Triglyceride und *p*-Nitrophenylester sind in Tab. 4-31 aufgeführt.

Tab. 4-31: Molekulargewicht und Anzahl der C-Atome der Fettsäure bei den verwendeten Lipasesubstraten und Substratanaloga.

Substrate	Σ C-Atome in der Fettsäure	M_w , g mol ⁻¹	Bezugsquelle
<u>Triglyceride</u>			
Triacetin	2	218	Fluka, Deutschland
Tributyrin	4	302	Fluka, Deutschland
Tricaproin	6	386	Fluka, Deutschland
Tricaprylin	8	471	Fluka, Deutschland
Tricaprin	10	555	Fluka, Deutschland
Triolein	18	885	Fluka, Deutschland
<u><i>p</i>-Nitrophenylester</u>			
<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat (<i>p</i> NPP)	16	378	Sigma, Deutschland

4.8.3 Bestimmung der Enzymaktivität

4.8.3.1 Enzymaktivitätsmessungen am Spektralphotometer

Die Messungen wurden an dem Spektralphotometer Ultrospec 3100pro der Firma Amersham Biosciences (Schweden) durchgeführt. Die Enzymaktivität (U) wurde definiert als die Enzymmenge, die in einer Minute 1 μmol Substrat umsetzt.

$$EA = \frac{\Delta A \cdot V_R}{\epsilon \cdot d \cdot V_E}$$

Gleichung 4-13

Die Berechnung der Enzymaktivität (EA; U mL^{-1}) bezogen auf die eingesetzte Enzymlösung (V_E , mL) ergibt sich aus der Adsorptionsänderung (ΔA , min^{-1}), dem Reaktionsvolumen (V_R , mL), dem Extinktionskoeffizienten (ϵ , $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$) und aus der Schichtdicke der Küvette ($d=1 \text{ cm}$) (Gleichung 4-13).

4.8.3.1.1 *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP)

Die enzymatische Hydrolyse von *p*NPP wurde als Standardmethode zur Bestimmung von Hydrolaseaktivitäten eingesetzt [Schmidt-Dannert et al. 1994]. Das gelbliche Spaltprodukt *p*-Nitrophenol wurde bei einer Wellenlänge von 400 nm erfasst. Die *p*NPP-Substratlösung (Tab. 4-32) wurde vor den Enzymaktivitätstests frisch angesetzt und zu je 960 μL in Glasröhrchen pipettiert und bei 25 °C im Wasserbad inkubiert.

Tab. 4-32: Substratlösung für *p*NPP-Enzymtest.

<u>Lösung 1</u>	
2-Propanol	100 % (v/v)
<i>p</i> NPP	3 g L^{-1}
<u>Lösung 2</u>	
Na-Phosphatpuffer, pH 7,1	192 mM
Na-Taurocholat	20 mM
Na-Taurocholat	2,3 g L^{-1}
Gummi arabicum	1,1 g L^{-1}

Lösung 1 und Lösung 2 wurden in einem Verhältnis von 1:10 gemischt. Die Pufferbestandteile der Lösung 2 wurden in milliQ-H₂O gelöst.

Nach Zugabe von 40 μL Enzymlösung in das Glasröhrchen wurde die Lösung gemixt, in eine Küvette überführt und für 2 min im Spektralphotometer gegen eine Referenzprobe ohne Enzym gemessen. Bei zu hohen Enzymaktivitäten wurde die Enzymlösung gegebenenfalls mit Lösung 2 verdünnt. Der molare Extinktionskoeffizient ε für *p*-Nitrophenol beträgt $9,62 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$.

4.8.3.1.2 BTA 40/60 Film

Für die Bestimmung des pH-Optimums der rTfH und PsL wurden photometrisch freiwerdende gelöste aromatische Polyesterspaltprodukte erfasst, die bei der Hydrolyse von BTA 40/60-Filmen (4 Filme, $\varnothing=5 \text{ mm}$) entstehen. Die Messungen wurden in 50 mM Phosphatpuffer in einem pH-Bereich von 5,5 bis 8,0 und bei einer Inkubationstemperatur von 55 °C erfasst. Das Fassungsvermögen der Quarzküvetten betrug 3 mL. Die Küvetten wurden unter leichtem Schütteln im Wasserbad temperiert. Nach Zugabe einer definierten Enzymmenge in einer Endkonzentration von $8,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Reaktionsgefäß erfolgte die Messung der Adsorptionszunahme in einer Dreifachbestimmung bei einer Wellenlänge von $\lambda=242 \text{ nm}$ und wurde über 2 h in 20 Minutenintervallen verfolgt. Dazu wurden die Küvetten kurzzeitig aus dem Wasserbad entnommen, gut durchmischt und im Spektralphotometer gegen einen Blindwert mit Puffer gemessen. Parallel zu der Dreifachbestimmung wurde eine Probe mit BTA 40/60-Filmen ohne Enzymlösung gemessen, dessen Adsorptionsänderung von den Proben mit Enzymlösung abgezogen wurde. Der Extinktionskoeffizient ε für den aromatischen Polyesterbestandteil Terephthalsäure beträgt $14,04 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ und wurde zur Kalkulation der Enzymaktivität (EA, U mL^{-1}) herangezogen (Gleichung 4-13).

4.8.4 Bestimmung der Enzymaktivität am pH-stat Titrator

4.8.4.1 Messanordnung

Beim pH-stat Enzymtest wurden die während der enzymatischen Hydrolyse von Estergruppen freiwerdenden Säuregruppen kontinuierlich neutralisiert. Eine pH-Elektrode maß den pH-Wert im Reaktionsansatz. Im Falle einer pH-Wert-Abnahme wurde durch Zugabe von Lauge der pH-Wert automatisch auf den gewünschten pH-Wert korrigiert. Das Volumen an zugegebener Lauge konnte mit der Abbaurate des Enzyms korreliert werden.

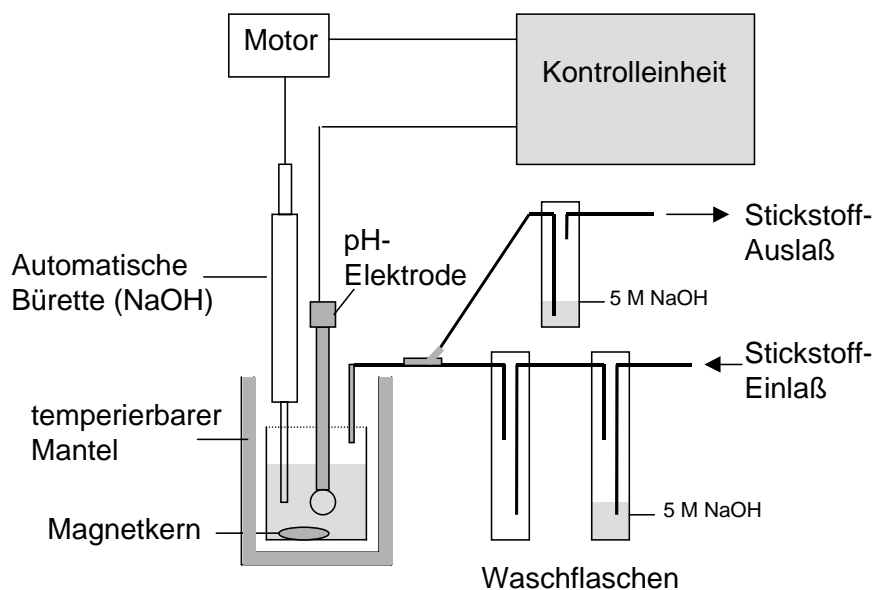


Abb. 4-7: Versuchsaufbau des pH-stat Titrators zur Bestimmung von Enzymaktivitäten. Die Abbildung wurde aus Marten [2000] entnommen.

Der Aufbau des pH-stat Titrationsanlage ist in Abb. 4-7 dargestellt und bestand aus einer Autobürette (ABU 901, Radiometer, Dänemark) mit 2 mL Fassungsvermögen und einer Kontrolleinheit (PHM 290, Radiometer). Das Reaktionsgefäß (10 mL Schnappdeckelgefäß, 1,8 cm³ Durchmesser und 5,5 cm Höhe) wurde mit einem Gummideckel verschlossen. In dem Gummideckel waren drei Aussparungen, durch welche die pH-Elektrode (InLab 423, Mettler Toledo, Schweiz) und die Kanülen für die Lauge- und Stickstoffzufuhr eingeführt waren. Die Temperaturregelung erfolgte mit Hilfe eines Reaktordoppelmantels mit angeschlossenem Thermostat (M3, mgw Lauda, Deutschland). Ein Magnetkern (Länge 0,9 cm, Ø 0,2 cm) im Reaktionsgefäß gewährleistete die Durchmischung der Reaktionslösung bei einer Rührgeschwindigkeit von 700 rpm. Der obere Reaktionsgefäßteil wurde mit Stickstoff begast, welches das Lösen von Kohlendioxid aus der Luft in der Reaktionslösung verhinderte. Die Schraubverschlüsse der Laugenflaschen waren mit CaCl₂-Granula gefüllt, um die Konzentration der Lauge über einen längeren Zeitraum stabil zu halten. Die pH-Elektrode wurde alle 24 h kalibriert. Vor der Kalibrierung wurde die Bürette mit Lauge gespült. Der Laugentiter wurde wöchentlich bestimmt.

4.8.4.2 Berechnung der Abbauraten und Enzymtests

4.8.4.2.1 Berechnung der Abbauraten

Die Anzahl der gespaltenen Esterverbindungen (n_{exp} , μmol) ergibt sich aus dem zutitrierten Volumen (V_{Lauge} , μL) und der Konzentration (c_{Lauge} , mol L^{-1}) der NaOH-Lösung.

$$n_{\text{exp}} = V_{\text{Lauge}} \cdot c_{\text{Lauge}} \quad \text{Gleichung 4-14}$$

Die Abbaurate (n_{EB} , $\mu\text{mol min}^{-1}$) gibt die Anzahl der Esterspaltungen bezogen auf einen bestimmten Zeitraum (t , min) an.

$$n_{\text{EB}} = \frac{dn_{\text{exp}}}{dt} \quad \text{Gleichung 4-15}$$

Die theoretisch möglichen Esterbindungen (n_{EBmax} , μmol) im Polyester und in den löslichen aromatischen Esterverbindungen berechnen sich nach der Gleichung 4-16 aus der Substratmasse (m , g), der Molmasse der Repetiereinheit (M_{Rep} , g mol^{-1}) und der Anzahl der Esterbindungen in einer Repetiereinheit ($n_{\text{EB/Mrep}}$, $-$).

$$n_{\text{EBmax}} = \frac{m}{M_{\text{Rep}}} \cdot n_{\text{EB / Mrep}} \quad \text{Gleichung 4-16}$$

Bezüglich der Triglyceride erfolgt die Bestimmung der theoretisch möglichen Esterverbindungen folgendermaßen:

$$n_{\text{EBmax}} = \frac{m}{M} \cdot 3 \quad \text{Gleichung 4-17,}$$

Dabei gibt M (in g mol^{-1}) das Molekulargewicht des jeweiligen Triglycerids an.

Aus dem molaren Verhältnis der tatsächlich gemessenen Esterspaltungen (n_{exp}) zu den theoretisch möglichen Esterbindungen multipliziert mit dem Faktor 100 berechnet sich der prozentuale Wert der eingetretenen Esterspaltungen (ES, %).

$$\text{ES} = \frac{n_{\text{exp}}}{n_{\text{EBmax}}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 4-18}$$

4.8.4.2.2 Enzymtests

Mittels des pH-stat Titrators wurde die Hydrolyse von Triglyceriden, Polyesterfilmen und Polyesternanopartikeln sowie die der löslichen aromatischen Ester BT und BTB bestimmt. Die Parameter der verschiedenen Enzymtests sind im Einzelnen in Tab. 4-33 beschrieben. Wenn nicht in der Tabelle erwähnt, sind die eingesetzten Enzym- und Substratkonzentrationen der einzelnen Versuche im entsprechenden Ergebnisabschnitt aufgeführt.

Tab. 4-33: Substrate und Parameter, die für die jeweiligen Enzymtests verwendet wurden

Enzymtest	Substrat	Lösungsmittel	Enzyme	Temperatur, °C
Temperaturoptimum	Triolein (50 $\mu\text{L mL}^{-1}$)	vgl. Tab. 4-34	rTfH / PsL	20-75
Grenzflächenaktivierung	Triacetin,	vgl. Tab. 4-34	rTfH / PsL	40
Triglyceridspektrum	Triglyceride (Tab. 4-31)	vgl. Tab. 4-34	rTfH / PsL	55
BT und BTB	BT (0,37 mg mL^{-1}) / BTB (0,23 mg mL^{-1})	milliQ-H ₂ O	rTfH / PsL	30
Polyesterfilme	1 Film, Ø 12 mm, 170±5 μm dick	milliQ-H ₂ O / 0,9 % NaCl-Lösung	rTfH / PsL / PhaZ5	20-55
Polyesternanopartikel	vgl. Tab. 4-30	milliQ-H ₂ O	rTfH / PsL / CcL / PhaZ5	37, 55
Polyestergranula	dP(3HB)	0-0,9 % NaCl-Lösung	PhaZ5	37

Tab. 4-34: Triglycerid-Substratlösung

<u>Triglyceridsubstratlösung</u>	
Triglycerid	0,5 mL
milliQ-H ₂ O	4,5 mL
Emulsionslösung	5 mL
<u>Emulsionslösung</u>	
NaCl	17,9 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,412 g L ⁻¹
Glycerin	661 g L ⁻¹
Gummi arabicum	6 g L ⁻¹

Die Triglyceridsubstratlösung wurde 1 min bei 13500 rpm homogenisiert. Die Emulsionslösung war über einen Monat haltbar. Zur Bestimmung der Grenzflächenaktivierung von PsL und rTfH wurde unter Konstanthaltung des Gesamtvolumens das Volumen von Triacetin und milliQ-H₂O entsprechend variiert.

Das Gesamtvolumen einschließlich der Enzymlösung betrug für alle Messungen 6 mL. Die Aktivitätstests wurden bei einem konstanten pH-Wert von 7,0 (für PhaZ5 bei pH 8,0) durchgeführt. Die Proben wurden vor der Enzymaktivitätsbestimmung für ca. 5 min bei der jeweiligen Temperatur temperiert. Die Hydrolyse der Esterverbindungen wurde durch Zugabe von Enzym initiiert. NaOH-Lösung in einer Konzentration von 0,01 bis 0,1 M diente als Base.

4.8.5 Bestimmung der Temperaturstabilität

PsL- und rTfH-Aliquote mit einer Proteinkonzentration von $1,4 \text{ mg mL}^{-1}$ wurden bei 30 °C und 55 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zu bestimmten Zeitintervallen wurden 100 µL entnommen und bis zur Messung der Enzymaktivität mit Hilfe des *p*NPP-Enzymtests (Kap. 4.8.3.1.1) bei -20 °C gelagert.

4.8.6 Polyesterspaltprodukte

Zur Untersuchung der Polyesterspaltprodukte aus der enzymatischen Hydrolyse von SP 4/6-Filmen und BTA 32/68-Filmen (beide Ø 12 mm) wurden pro Messreihe 4 Glasgefäße (Ø 3 cm bei 5 cm Höhe), in denen sich je ein abgewogener Polyesterfilm befand, benutzt. In einem Gesamtvolumen von 5 mL (Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,2) betrug die eingesetzte Enzymmenge 150 µg rTfH bzw. 270 µg PsL. Die Glasgefäße wurden mit einer Plastikkappe verschlossen und zusätzlich mit Parafilm versiegelt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C (SP 4/6-Film) bzw. 55 °C (BTA 32/68-Film) und leichtem Schütteln. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde ein Glasgefäß aus dem Inkubator entnommen. Mittels einer Hitzeinaktivierung bei 70 °C für 20 min wurde die weitere enzymatische Hydrolyse gestoppt und der wässrige Überstand anschließend im Vakuumtrockenschrank bei 45 °C entfernt, wobei Salze, Polyester und Polyesterspaltprodukte als weiße Feststoffe im Glasgefäß verblieben. Der Rückstand wurde abschließend in einem definierten Volumen Chloroform aufgenommen und in der GPC (Kap. 4.7.1) analysiert. Aufgrund der Probenaufbereitung blieben in Chloroform unlösliche Polyesterspaltprodukte unberücksichtigt.

4.8.7 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Präparation der PET-Nanopartikelsuspensionen und die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Heinrich Lünsdorf (Abteilung Mikrobiologie, HZI Braunschweig) durchgeführt. Für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden native PET-Nanopartikel und PET-Nanopartikel nach ca. 20%igen Abbau präpariert. Im Bezug auf die enzymatisch hydrolysierten PET-Nanopartikel wurde der Abbau durch Absenken des pH-Wertes auf pH 4,0 mit 0,1 M HCl unterbrochen. Die PET-Suspensionen wurden auf 3 mesh Kupfer-Trägernetzchen adsorbiert, die mit einem Kohle/Formvar-Film beschichtet waren. Die Kontrastierung der Partikel erfolgte mittels Negativfärbung mit 4 % (w/v) Uranylacetat.

4.9 Strukturvorhersage des dreidimensionalen Tfh-Proteinmodells

Das dreidimensionale Proteinmodell der Tfh wurde basierend auf der bekannten Röntgenstruktur der *Streptomyces exfoliatus* Lipase (SeL) (PDB Code: 1JFR) [Wei et al. 1998] nach dem Verfahren des „Homology Modelling“ in Zusammenarbeit mit J. Reichelt (Abt. Strukturbiologie, HZI Braunschweig) erstellt. Ausgehend von einem Sequenzalignment beider Aminosäuresequenzen (Software: ClustalW, [Thompson et al. 1994]) wurde ein erstes dreidimensionales Proteinmodell mit Hilfe des Computerprogramms BRAGI entworfen [Schomburg und Reichelt 1988, Reichelt et al. 2005]. Die Seitenketten wurden und die Loopstrukturen wurden manuell angepasst. Das Proteinmodell wurde mittels Energieminimierung in je 200 Zyklen überprüft (Computerprogramm: AMBER, [Cornell et al. 1995]). Das endgültige Proteinmodell wurde abschließend nach dem Prinzip des „Simulated Annealing“ unter Verwendung des folgenden Profils berechnet: Aufheizphase auf 610 K in 10 ps, Haltephase bei 10 ps bei 610 K, Abkühlphase in 10 ps auf 310 K und abschließend einer Equilibrierphase bei 310 K.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Produktion und Reinigung der rekombinanten TfH

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine Strategie zur optimierten Produktion der Hydrolase aus *Thermobifida fusca* in einem *E. coli* Stamm zu entwickeln. In Vorarbeiten wurde dazu in Kooperation mit Herrn Dr. Joop van den Heuvel das TfH-Gen *bta1* aus der chromosonalen DNA des *T. fusca* Stammes isoliert, aufgereinigt und am 5'-Ende mit der *ompA*-Signalsequenz versehen, um eine Sekretion ins Periplasma zu gewährleisten (Kap. 3.6.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem das 3'-Ende der *bta1*-Sequenz mit einem His₆-Tag (zur Affinitätsaufreinigung) fusioniert und die resultierende Gensequenz in den Expressionsvektor pCytexP1 kloniert (Kap. 4.2).

Die Expression der TfH wurde über den thermolabilen Promotor $\lambda_{p_{RPL}}$ kontrolliert und somit bei einer Erhöhung der Kultivierungstemperatur induziert (Kap. 4.2). *E. coli* TG1 wurde als Produktionsstamm ausgewählt, da hiermit das anvisierte Ziel einer Hochzelldichtekultivierung möglich ist [Seeger et al. 1995, Hoffmann und Rinas 2000].

Im Folgenden wird die Produktion der rekombinanten TfH (rTfH) mit *E. coli* TG1:p λ TfH in Batch- und Hochzelldichtekultivierungen unter dem Einfluss unterschiedlicher Medienzusammensetzungen und Induktionstemperaturen dargestellt. Danach werden Wege zur Aufreinigung der rTfH entworfen. Abschließend werden die Ergebnisse der einzelnen Kultivierungen unter Einbeziehung von Literaturstellen zusammenfassend diskutiert.

5.1.1 Batchkultivierungen

Zu Beginn wurden sondierende Batchkultivierungen in einem 1 L Bioreaktor mit LB-Medium und synthetischem Medium durchgeführt, wobei die Kontrolle des Kultivierungsverlaufes über Messung der optischen Dichte (OD), der Biotrockenmasse (BTM), der Glukose- und der Metabolitenkonzentration im Überstand erfolgte. Die rTfH Produktion wurde bei einer OD von 0,6 durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 30 °C auf 39 °C bzw. 42 °C induziert und die Enzymanreicherung in der periplasmatischen und extrazellulären Fraktion am Spektralphotometer über die Spaltung von *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP) bei einer Wellenlänge von 400 nm erfasst (Kap. 4.8.3.1.1).

5.1.1.1 Batchkultivierung im LB-Medium

In Abb. 5-1 sind die Batchkultivierungen mit LB-Medium bei einer Induktionstemperatur von 39 °C und 42 °C dargestellt. Der Beginn der Kultivierung in LB-Medium war durch einen raschen Verbrauch der im LB-Medium vorhandenen Glukose ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) gekennzeichnet (Abb. 5-1c). Parallel zur Glukoseabnahme konnte ein Anstieg von Acetat im Kulturüberstand beobachtet werden, welches nach vollständigem Verbrauch der Glukose auch metabolisiert wurde.

Der Gesamtverbrauch der C-Quellen spiegelte sich in der Biomassenzunahme wieder (Abb. 5-1a). Die Wachstumsrate der Zellen war dabei in Gegenwart von Glukose am höchsten und nahm signifikant nach dessen Metabolisierung ab. Die CO_2 -Zunahme im Abgas (Abb. 5-1a) untergliederte sich in drei Bereiche, die in Höhe des CO_2 -Ausstosses variierten, und korrelierte mit der Verstoffwechslung der Glukose und des Acetats. Nach dem Verbrauch der genannten Kohlenstoff-Quellen war weiterhin sowohl in der Biomasse als auch in der CO_2 -Bildung ein leichter Anstieg zu beobachten, welcher sich höchstwahrscheinlich auf die Verwertung komplexer Medienbestandteile wie Hefextrakt und Trypton zurückführen lässt. Mit beiden Batchkultivierungen wurde eine Gesamtbiomasse von $2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ erreicht. Aufgrund der nicht bekannten Zusammensetzung der einzelnen C-Quellen (Hefeextrakt/Trypton) konnte keine Kohlenstoff-Bilanzierung durchgeführt werden.

Die Induktion der rekombinanten Hydrolase aus *Thermobifida fusca* wurde durch die Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 39 bzw. 42 °C bei einer optischen Dichte von 0,6 initiiert (Abb. 5-1b). Bei beiden Induktionsprofilen war zunächst ein vergleichbarer Verlauf der rTfH-Bildung zu beobachten. Wie erwartet wurde rTfH (aufgrund des Signalpeptids OmpA am N-Terminus der Aminosäuresequenz; Kap. 3.6.3) über den Sec-abhängigen Sekretionsweg in den periplasmatischen Raum sekretiert. Allerdings akkumulierte rTfH nicht im Periplasma und wurde über die äußere Zellwand in den Kulturüberstand freigesetzt. Zum Ende der Induktionsphase war die im Periplasma lokalisierte rTfH vollständig in den Kulturüberstand übergegangen.

Ein Vergleich der Produktionsraten der rTfH bei den untersuchten Induktionstemperaturen zeigte, dass das Promotortandem λ_{pRP_L} des Expressionsvektors $\text{p}\lambda\text{TfH}$ bei 42 °C zunächst etwas stärker angeschaltet wurde. So wurden zu Beginn der Induktion leicht höhere volumetrische Aktivitäten erzielt. Jedoch hob sich dies im Verlauf der Induktion wieder auf und resultierte schließlich in einer 1,8fach höheren volumetrischen Aktivität bei 39 °C. Demnach wäre zur Produktion der rTfH die Induktion bei 39 °C vorzuziehen.

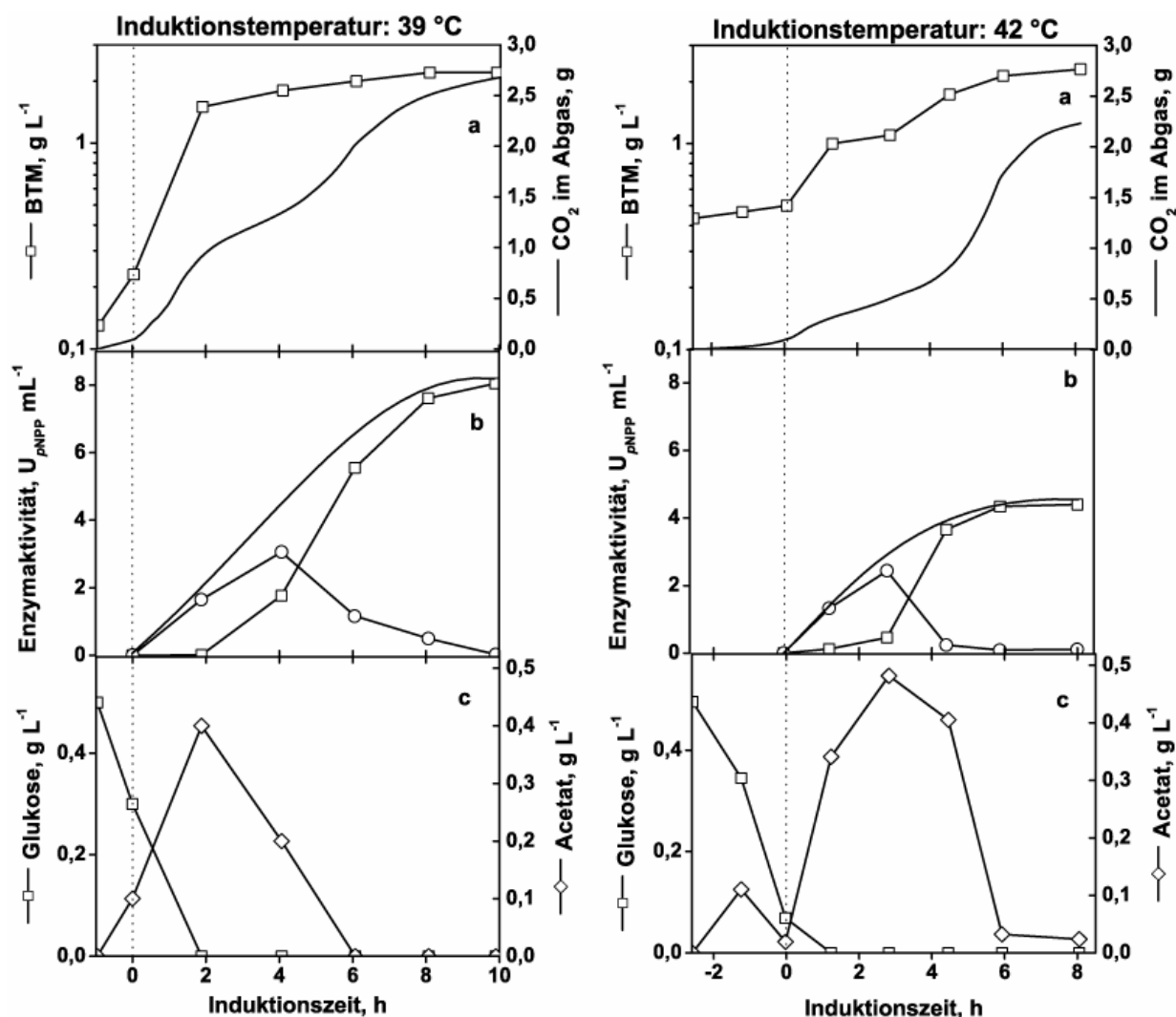


Abb. 5-1: Der Kultivierungsverlauf und die heterologe Genexpression der rTfH in *E. coli* TG1:pλTfH in einer Batchkultivierung mit LB-Medium vor und nach erfolgter Induktion. Vor Induktionsbeginn (gepunktete Linie) erfolgte die Kultivierung bei 30 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,6. Die Induktion der rTfH Produktion wurde durch eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 30 °C auf 39 bzw. 42 °C initiiert. **a:** Verlauf der Biomassezunahme und der CO₂-Zunahme im Abgas. **b:** rTfH Aktivität in der periplasmatischen Fraktion (—○—) und im Kulturüberstand (—□—). Die durchgezogene Linie zeigt die Summe der Aktivitäten in beiden Fraktionen. **c:** Glukose- und Acetatkonzentration im Kulturüberstand.

5.1.1.2 Batchkultivierung im synthetischen Kulturmedium

Vergleichend zur Produktion der rTfH im LB-Medium wurde diese auch in einem synthetischen Kulturmedium nach Korz et al. [1995] untersucht. Ein Vorteil synthetischer Kulturmedien ist die bekannte Zusammensetzung der einzelnen Medienbestandteile, aufgrund dessen möglicherweise Rückschlüsse auf Wachstum und Produktbildung gezogen werden können.

Der Kultivierungsverlauf im synthetischen Kulturmedium ist in Abb. 5-2 gezeigt. Die Biotrockenmassenzunahme (Abb. 5-2a) war an den Verbrauch von Glukose gekoppelt. Parallel zum Glukosekonsum (Abb. 5-2c) reicherte sich temporär Acetat und später Succinat im Kulturüberstand an. Bei einer Induktionstemperatur von 42 °C war zusätzlich zeitweise Propionat im Kulturüberstand zu finden.

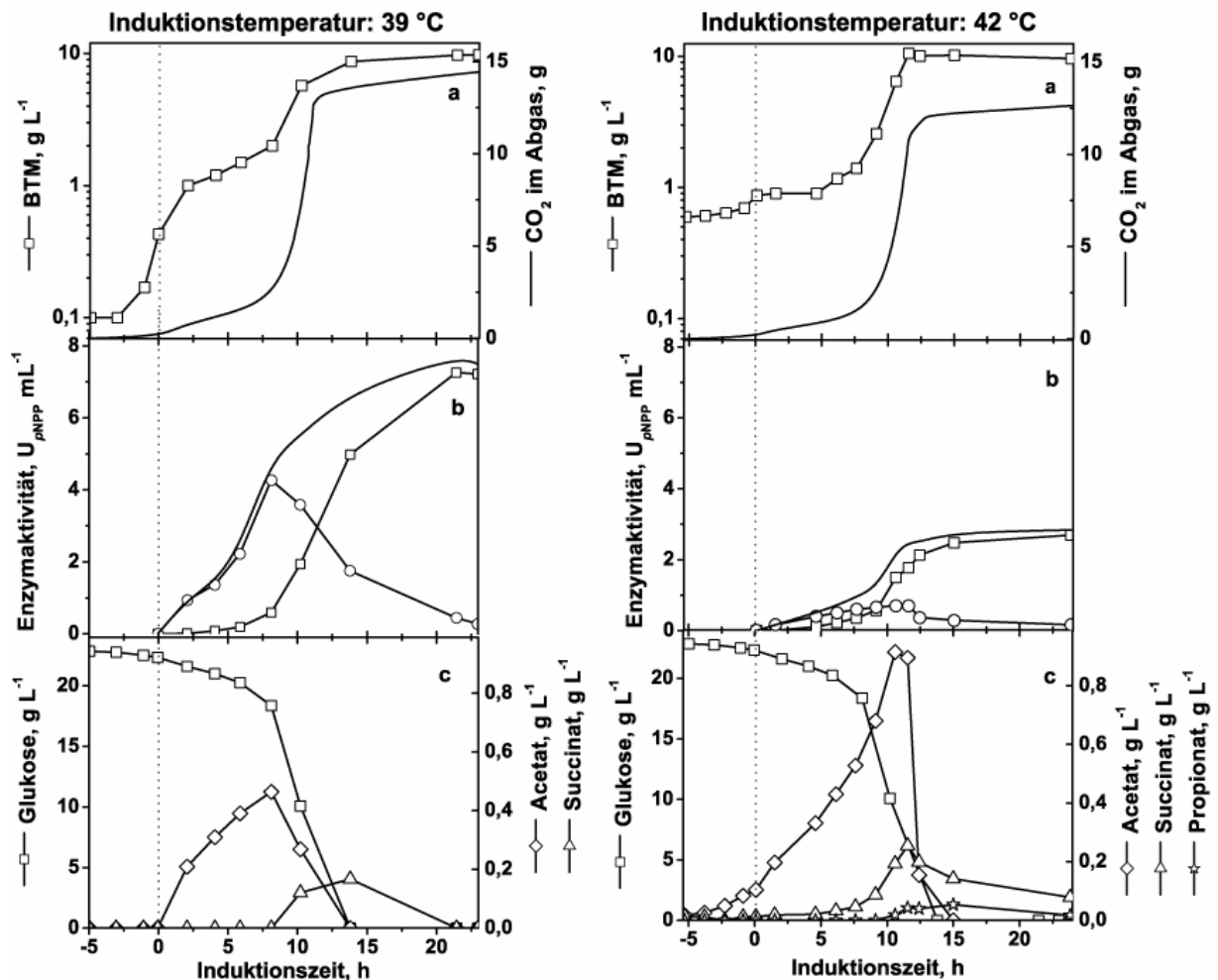


Abb. 5-2: Der Kultivierungsverlauf und die heterologe Genexpression der rTffH in *E. coli* TG1:pλTffH in einer Batchkultivierung mit dem synthetischen Kulturmedium vor und nach erfolgter Induktion. Die Glukosekonzentration zu Versuchsbeginn betrug 23 g L⁻¹. Die Kultivierung erfolgte vor Induktionsbeginn bei 30 °C bis zu einer OD von 0,6. Die Induktion rTffH Produktion wurde durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 30 °C auf 39 bzw. 42 °C initiiert (gepunktete Linie). **a:** Verlauf der Biomassezunahme und der CO₂-Zunahme im Abgas. **b:** rTffH Aktivität in der periplasmatischen Fraktion (—○—) und im Kulturüberstand (—□—). Die durchgezogene Linie zeigt die Summe der Aktivitäten in beiden Fraktionen. **c:** Glukose- und Metabolitkonzentration im Kulturüberstand.

Die im Kulturüberstand gefundenen Metabolite Succinat und Propionat sind üblicherweise Produkte des anaeroben Stoffwechsels. In *E. coli* entstehen diese bei der gemischten Säuregärung und der Fumaratatmung [Neidhardt et al. 1990]. Beide Stoffwechselwege stehen unter der strikten Kontrolle des globalen Regulators für anaerobe Stoffwechselvorgänge Fnr (*fumarate nitrate reduction*). Infolge der Prozessparameter, welche einen Sauerstoffpartialdruck von mindestens 20 % sicherstellten, konnten anaerobe Wachstumsbedingungen in den vorliegenden Batchkultivierungen jedoch ausgeschlossen werden. Die Bildung von Succinat in der Batchkultivierung im synthetischen Medium war mit einer starken Zunahme des CO₂ im Abgas (Abb. 5-2a) und somit mit einer verstärkten Zunahme der metabolischen Aktivität verknüpft. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Korz [1993] in Batchkultivierungen mit synthetischem Medium gemacht, woraufhin ein Zusammenhang zwischen der Succinat- und der CO₂-Bildung hergestellt wurde. Gründe hierfür könnten ein Ungleichgewicht im Citratzyklus oder der Reduktionsäquivalente sein. Diese Vermutung ließe sich aber nur durch eine gezielte Untersuchung weiterer Metabolite im Citratzyklus belegen.

In den Batchkultivierungen wurde durch die Glukoseanfangskonzentration von 23 g L⁻¹ eine Gesamtbiotrockenmasse von etwa 10 g_{BTM} L⁻¹ erreicht (Abb. 5-2a). Nach der Induktion der rTfH Produktion war in beiden Kultivierungen zunächst eine Verringerung der Wachstumsrate (Abb. 5-2a) zu beobachten. Erst nach ca. 8 h stieg diese wieder auf $\mu = 0,5 \text{ h}^{-1}$ ($\mu = 0,6 \text{ h}^{-1}$) bei einer Induktionstemperatur von 39 °C (42 °C) an. Der Anstieg der Wachstumsrate war zugleich an eine deutliche Zunahme des CO₂ im Abgas gekoppelt. Nach Verbrauch der gesamten Glukose war keine signifikante Zunahme der Biomasse und des CO₂ mehr zu verzeichnen. Der Respirationskoeffizient RQ lag während des gesamten Kultivierungsverlaufes bei etwa 1 und der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{BTM/GLC}}$ bei 0,4 g g⁻¹. Die Kohlenstoff-Bilanzierung über den gesamten Kultivierungsverlauf ergab einen Wert von $100 \pm 3\%$.

Die Translokation der rTfH im definierten Medium zeigte einen vergleichbaren Verlauf zu derjenigen im LB-Medium, war insgesamt aber deutlich langsamer. Erst nach ca. 23 h war die Sekretion der rTfH vollständig beendet. Unabhängig von der Induktionstemperatur war parallel zum CO₂-Anstieg im Abgas eine deutliche Translokation der rTfH in den Kulturüberstand zu beobachten, die somit offenbar an die Wachstumsrate gekoppelt zu sein scheint. Ein Vergleich der erreichten volumetrischen Gesamtaktivitäten zeigte, dass die Induktion der rTfH Produktion bei 39 °C, analog zu den Kultivierungen im LB-Medium, zu deutlich höheren Aktivitäten führte.

5.1.1.3 Zusammenfassung der Batchkultivierungen

In Tab. 5-1 sind die wesentlichen Daten der Batchkultivierungen mit *E. coli* TG1:pλTfH und die Gesamtaktivitäten im Kulturüberstand nochmals zusammengefasst. Zudem sind die spezifischen Aktivitäten und sowohl die volumetrischen als auch die spezifischen Produktivitäten angegeben. Bei beiden Induktionstemperaturen wurden im jeweiligen Medium annähernd gleiche Biomassen erreicht. Die volumenbezogene Aktivitätsausbeute ($U_{pNPP} \text{ mL}^{-1}$) war in beiden Medien bei 39 °C deutlich höher und erreichte vergleichbare Endwerte. Obwohl im LB-Medium die volumetrischen Aktivitäten unterschiedlich waren, ist bei Kultivierungsende aufgrund der kürzeren Induktionsdauer die spezifische Produktivität ($U_{pNPP} (\text{g}_{BTM} \text{ h})^{-1}$) nahezu identisch. Für die Batchkultivierungen im synthetischen Medium ließ sich dieses Ergebnis nicht reproduzieren. Eine höhere Induktionstemperatur führte hier nicht zu einer vergleichbaren spezifischen Produktivität.

Tab. 5-1: Zusammenfassende Darstellung über den Kultivierungsverlauf und die Produktbildung der rTfH mit *E. coli* TG1:pλTfH nach Kultivierungsende in den Batchkultivierungen mit LB-Medium und synthetischen Medium. Die Kultivierung erfolgte vor Induktionsbeginn bei 30 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,6. Anschließend wurde zur Induktion der rTfH-Genexpression die Kultivierungstemperatur auf 39 bzw. 42 °C erhöht.

	Batchkultivierung im Reaktor			
	LB-Medium		Synthetisches Medium	
Induktionstemperatur, °C	39	42	39	42
Biomasse, $\text{g}_{BTM} \text{ L}^{-1}$	2,2	2,1	9,8	9,6
Induktionszeit, h	9,9	6	23	23,7
Volumetrische Aktivität, $10^3 U_{pNPP} \text{ L}^{-1}$	8,08	4,43	7,5	2,84
Spezifische Aktivität, $10^3 U_{pNPP} \text{ g}_{BTM}^{-1}$	3,67	2,11	0,77	0,30
Vol. Produktivität, $10^3 U_{pNPP} (\text{Lh})^{-1}$	0,82	0,74	0,33	0,12
Spez. Produktivität, $10^3 U_{pNPP} (\text{g}_{BTM} \text{ h})^{-1}$	0,373	0,352	0,034	0,013

Unter Berücksichtigung der signifikant unterschiedlichen Biomassen in den Kultivierungen ergibt sich für das synthetische Kulturmedium eine geringere spezifische Aktivität ($U_{pNPP} \text{ mg}_{BTM}^{-1}$). Unter Einbeziehung der längeren Induktionsdauer im synthetischen Kulturmedium vervielfacht sich diese Divergenz besonders bei der spezifischen Produktivität ($U_{pNPP} (\text{g}_{BTM} \text{ h})^{-1}$) um mindestens eine Zehnerpotenz. Die signifikant höheren spezifischen Produktivitäten im LB-Medium lassen sich vermutlich auf im Medium vorhandene komplexe Zusätze zurückführen. Im LB-Medium sind gewöhnlich alle notwendigen Komponenten

enthalten, die eine schnelle Synthese von homologen und heterologen Proteine ermöglichen und somit zu höheren Wachstumsraten und höherer Proteinsynthese führen [Broedel et al. 2001, Rothen et al. 1998]. Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass eine Batchkultivierung im LB-Medium dem im synthetischen Kulturmedium bei 39 °C Induktion vorzuziehen wäre.

Im Gegensatz zu heterolog produzierten Proteinen mit cytoplasmatischer Lokalisation, bei denen im Allgemeinen direkt nach der Induktion eine rasche Zunahme des heterologen Genprodukts im Cytoplasma zu beobachten ist [Seeger et al. 1995], zeichnete sich die Produktionskinetik der rTfH unabhängig von der Kultivierung durch einen kontinuierlich langsamen Anstieg der Enzymaktivität im Periplasma (Abb. 5-1b, Abb. 5-2b) und im Kulturüberstand aus. Dies deutet darauf hin, dass die Sec-abhängige Translokation vom Cytoplasma ins Periplasma langsamer verläuft als die Genexpression der rTfH, welches wiederum bedeuten würde, dass sich rTfH im Cytoplasma kurzweilig anreichern müsste. Diese Vermutung wird durch Ergebnisse aus Schüttelkulturen mit rekombinanten *E. coli* TG1:pλTfH in einem M9-Minimalmedium gestützt, in denen zusätzlich zur Aktivität im Periplasma und im Kulturüberstand die Aktivität im Cytoplasma verfolgt wurde (Anhang Abb. 7-1). Das Aufsummieren der rTfH-Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen zeigte, dass sich nach einer fünf- bis siebenstündigen Induktion die rTfH-Gesamtaktivität (Kulturüberstand, Periplasma, Cytoplasma) nur noch geringfügig änderte. Anschließend wurden nur noch Transportvorgänge vom Cytoplasma über das Periplasma und vom Periplasma in den Kulturüberstand beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass die Sec-abhängige Translokation offenbar der geschwindigkeitslimitierende Schritt im heterologen Produktionsprozess der rTfH ist.

5.1.1.4 Untersuchung der rTfH Freisetzung in den Kulturüberstand

Die Freisetzung von rTfH in den Kulturüberstand kann durch eine erhöhte Permeabilität („Leakage“) der äußeren Zellwand oder durch Zelllyse hervorgerufen werden. Ersteres würde zur Freisetzung periplasmatisch lokalisierter rTfH und zweiteres zur Freisetzung von sowohl cytoplasmatisch als auch periplasmatisch lokalisierter rTfH führen. Zur Klärung der Frage, durch welche Mechanismen rTfH freigesetzt wird dienen die im folgenden Abschnitt durchgeführten Experimente.

Mit Hilfe der SDS-Gelanalyse wurde die Proteinanreicherung im Kulturüberstand über den gesamten Induktionszeitraum verfolgt. Abb. 5-3 stellt exemplarisch die Proteinanreicherung im Kulturüberstand nach erfolgter Induktion bei 39 °C dar. Im LB-Medium waren nach 4 h Induktion erste Proteinbanden in dem SDS-Gel zu erkennen. Neben der rTfH Bande waren auch eine Vielzahl anderer Proteine zu finden.

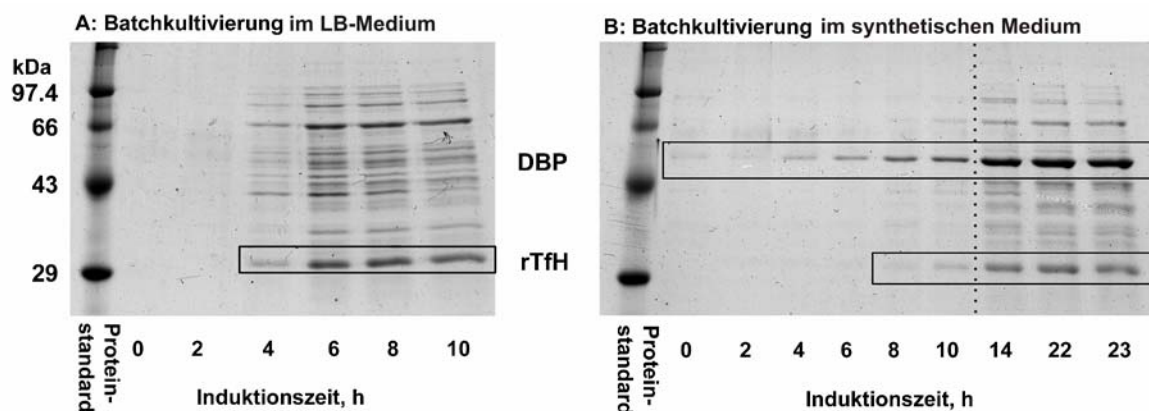


Abb. 5-3: SDS-Gel der Kulturüberstände in den Batchkultivierungen mit LB-Medium (A) und synthetischem Medium (B) über den gesamten Induktionszeitraum nach Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 30 °C auf 39 °C. Die rTfH und das „dipeptide binding protein“ (DBP) sind durch einen schwarzen Kasten hervorgehoben. Die gepunktete Linie zeigt in (B) den Beginn der C-Limitierung an.

Im synthetischen Medium wurde die erste rTfH Proteinbande erst nach 8 h Induktion beobachtet. Gleichzeitig traten neben den erwähnten Proteinbanden auch weitere Banden im SDS-Gel auf. Zwischen den Probenahmen nach 10 und 14 h Induktion war ein sprunghafter Anstieg der Bandenstärke zu verzeichnen. Das SDS-Gel zeigt, dass die verstärkte Freisetzung der Proteine unspezifisch zu sein scheint, da alle Banden an Stärke zunahmten. Danach veränderte sich die Intensität der Banden nur noch geringfügig. Die Zeitspanne von 10 bis 14 h umfasste den Bereich, in welchem eine deutliche Zunahme der Biotrockenmasse und des CO₂-Gehaltes im Abgas beobachtet wurde (Abb. 5-2a). Demnach wäre die Freisetzung gegebenenfalls wachstumsgekoppelt. Auf der anderen Seite könnte die Freisetzung der Proteine auch an den Übergang in die C-Limitation (dargestellt durch die gepunktete Linie im SDS-Gel) gebunden sein. Der gleiche Effekt ist auch bei der Kultivierung im LB-Medium zu beobachten, wo die Bandenstärke (4-6 h Induktion) nach Verbrauch von Glukose und Acetat zunimmt.

Bereits zum Induktionszeitpunkt $t = 0$ war eine Proteinbande bei 57,4 kDa im SDS-Gel von der Batchkultivierung mit synthetischem Medium (Abb. 5-3B) zu erkennen, die im Laufe der Induktion weiter zunahm. Über N-terminale Aminosäuresequenzierung wurde diese Proteinbande als das im Periplasma lokalisierte „dipeptide binding protein“ (DBP) identifiziert. Dieses Protein ist in den Transport von Dipeptiden im Periplasma eingebunden [Abouhamad et al. 1991]. In der Kultivierung im LB-Medium konnte DBP aufgrund der Vielzahl der Proteinbanden nicht eindeutig identifiziert werden, aber nicht auszuschließen ist, dass DBP auch hier im Kulturüberstand zu finden ist. Die Identifizierung von DBP deutet darauf hin, dass rTfH gegebenenfalls durch erhöhte Permeabilität der äußeren Zellwand ins Kulturmedium freigesetzt wird.

Um eine Zellyse der *E. coli* TG1:pλTfH Zellen in der Batchkultivierung und somit eine Freisetzung cytoplasmatisch lokalisierter rTfH in den Kulturüberstand auszuschließen, wurden die N-terminalen Aminosäuresequenzen der rekombinanten TfH analysiert. Im Falle einer Zellyse sollten sich neben richtig prozessierter rTfH auch noch rTfH mit dem OmpA-Signalpeptid am N-Terminus finden lassen. In Abb. 5-4 sind die Häufigkeiten der einzelnen auffindbaren N-Aminosäuretermina der im Kulturüberstand lokalisierten rTfH dargestellt.

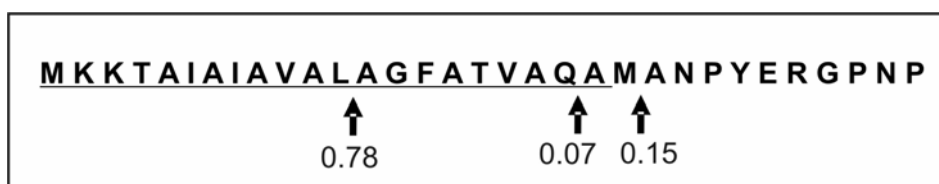


Abb. 5-4: N-Terminus der rTfH mit der OmpA-Signalsequenz (unterstrichen). Die Pfeile markieren die Schnittstellen der Signalpeptidase. Die Zahlen geben die relative Häufigkeit der rTfH mit entsprechendem N-Terminus, die im Kulturüberstand gefunden wurde, wieder. Das Probenmaterial stammt aus dem Kulturüberstand der Batchkultivierung im synthetischen Kulturmedium nach 23 h Induktion bei 39 °C.

Eine Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenzen zeigte, dass eine Freisetzung von rTfH in das Kulturmedium nicht aufgrund von Zellyse erfolgte, da keine rTfH mit vollständigen Signalpeptiden OmpA identifiziert wurde. Unabhängig davon ist zu erkennen, dass der N-Terminus uneinheitlich ist und die Signalpeptidase das Signalpeptid vom sekretierenden Protein an unterschiedlichen Schnittstellen abtrennte. Dabei wurde das Signalpeptid regelgerecht durch die Peptidase am Erkennungsmotiv A-X-A gespalten, wobei der Rest A-X am abgespaltenden Peptid verblieb. Die unvollständige Prozessierung des Signalpeptids von reifen Proteinen ist in Kultivierungen mit rekombinanter *E. coli* nicht unbekannt [Choi und

Lee 2004]. Möglicherweise ist die Sec-abhängige Translokation unter den gegebenen Bedingungen der heterologen Enzymproduktion überlastet, was zu einer uneinheitlichen Hydrolyse des Signalpeptids OmpA führt. Die Identifizierung des periplasmatisch lokalisierten DBP und die Analyse der N-Termina der rTfH weisen darauf hin, dass die äußere Zellwand aufgrund bisher nicht geklärter Mechanismen permeabel ist und es so zur Freisetzung periplasmatisch lokalisierter Proteine kommt.

5.1.2 Produktion von rTfH mit Hilfe der Hochzelldichtekultivierung

Für die Produktion der rekombinanten rTfH in der Hochzelldichtekultivierung (HDF) (Kap. 3.6.2) wurde das Fed-Batch Verfahren nach Korz et al. [1995] gewählt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte hierbei in drei Phasen: Batch, Fed-Batch I und Fed-Batch II. Während in der Batchphase, welche zur Anzucht der Bakterien diente, das Bakterienwachstum unlimited erfolgte, wuchsen die Zellen in der sich anschließenden Fed-Batchphase I unter C-limitierenden Bedingungen mit reduzierter spezifischer Wachstumsrate. Bei einer Biotrockenmasse von ca. $40 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ wurde durch Induktion die Fed-Batchphase II eingeleitet, in der die Produktion der rTfH analog zur Fed-Batchphase I unter kohlenstofflimitierenden Bedingungen erfolgte.

Um das Bakterienwachstum in den Fed-Batchphasen zu kontrollieren, ist eine bekannte definierte Medienzusammensetzung eine wichtige Voraussetzung für die Kultivierung. Aufgrund dessen sind komplexe Medien mit unbekannter Zusammensetzung der C-Quellen (im Falle des LB-Mediums Hefeextrakt und Trypton) für das Fed-Batch Verfahren ungeeignet. Daher wurden die folgenden Hochzelldichtekultivierungen im synthetischen Kulturmedium durchgeführt, obwohl hier in den Batchkultivierungen niedrigere spezifische Produktivitäten ($U_{\text{pNPP}} (\text{g}_{\text{BTM}}\text{h})^{-1}$) erzielt wurden (Tab. 5-1). Da die Batchkultivierungen zeigten, dass die spezifische Produktivität der *E. coli* TG1:pλTfH Zellen bei einem Induktionsprofil von 39 °C eindeutig höher war, wurde die rTfH Produktion bei einer Induktionstemperatur von 39 °C eingehender untersucht.

In Abb. 5-5 sind die Verläufe von zwei Hochzelldichtekultivierungen mit anschließender Induktion bei 39 °C dargestellt. Die Anfangsglukosekonzentration betrug in beiden Hochzelldichtekultivierungen 24 g L^{-1} .

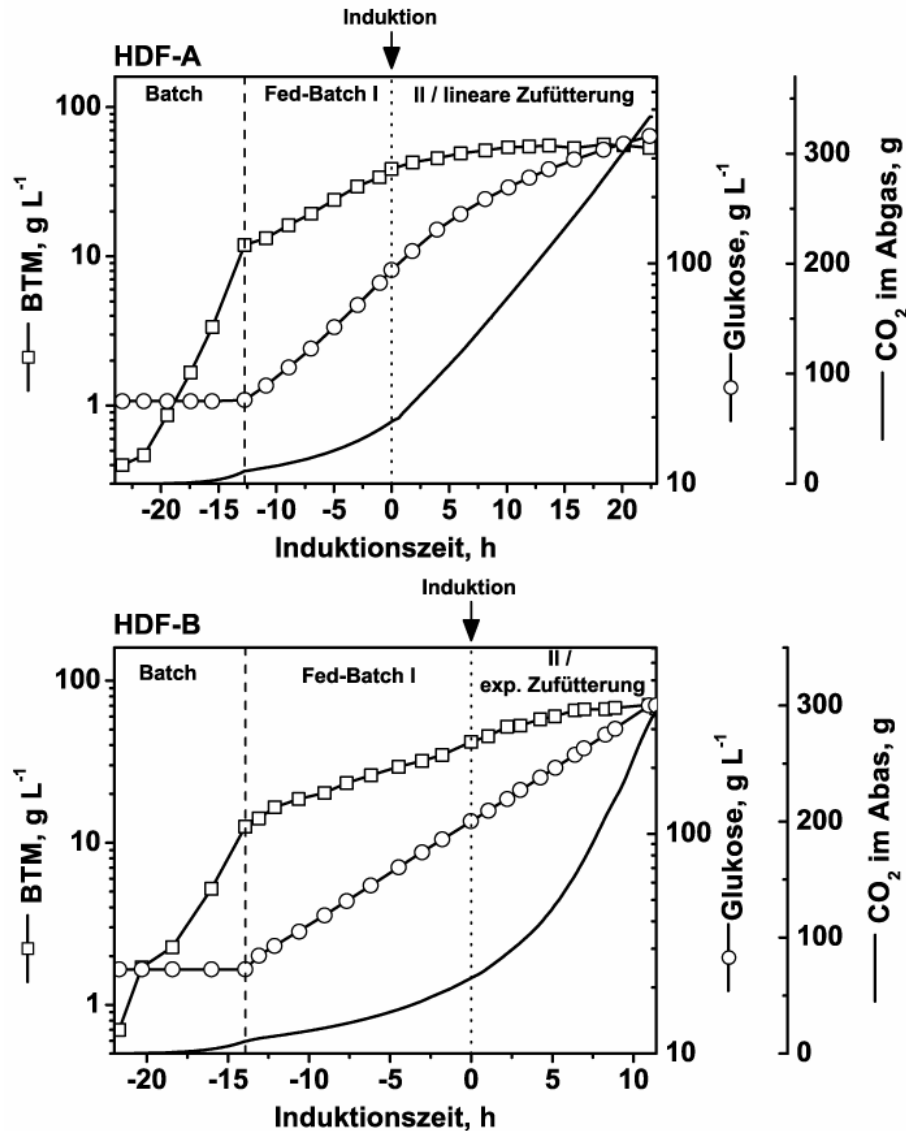


Abb. 5-5: Kultivierungsverlauf der Hochzelldichtekultivierungen zur Produktion der rTfH in *E. coli* TG1:pλTfH mit linearer (HDF-A) und exponentieller (HDF-B) Zufütterungsrate nach erfolgter Induktion. Die Anfangsglukosekonzentration zu Beginn der Kultivierung betrug 24 g L⁻¹. Die Kultivierung der Zellen erfolgte vor Induktionsbeginn bei 30 °C. Die Induktion der heterologen Genexpression durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 39 °C ist durch die gepunktete Linie dargestellt. **HDF-A:** Die Fed-Batch Phase (gestrichelte Linie) mit exponentieller Zufütterungsstrategie (Fed-Batch I, $\mu_{\text{set}}=0,12 \text{ h}^{-1}$) wurde nach 10,6 h Batchphase (Batch) gestartet. rTfH Produktion wurde nach 23,3 h Kultivierung (Fed-Batch II) initiiert, wobei die Zufütterungsrate von exponentiell auf eine konstante Rate von $F=12,8 \text{ g}_{\text{glc}} \text{ h}^{-1}$ gestellt wurde. **HDF-B:** Nach der Batchphase (Batch, gestrichelte Linie) mit einer Länge von 7,8 h wurde die Fed-Batch Phase (Fed-Batch I) mit exponentieller Zufütterung ($\mu_{\text{set}}=0,12 \text{ h}^{-1}$) initiiert. Induktion (Fed-Batch II) erfolgte nach 21,7 h Kultivierung. Die Zufütterungsprofil blieb unverändert.

Während der Batchphase wuchsen die Zellen unlimited mit einer Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,47 \text{ h}^{-1}$ und eine Anreicherung von Acetat im Kultivierungsmedium wurde beobachtet (Abb. 5-6), wobei allerdings zum Ende der Batchphase hin die Acetatkonzentration wieder abnahm. Am Ende der ersten Kultivierungsphase wurden in beiden Versuchen eine Gesamtbiotrockenmasse von $12 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ erreicht. Während der gesamten Fed-Batchphase I wuchs die Kultur unter C-limitierenden Bedingungen (Abb. 5-6). In der HDF-A betrug die Biotrockenmasse nach der Fed-Batchphase I mit einer Dauer von 12,8 h $38,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$. Analog dazu wurden in der HDF-B $42 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ in 13,9 h erreicht.

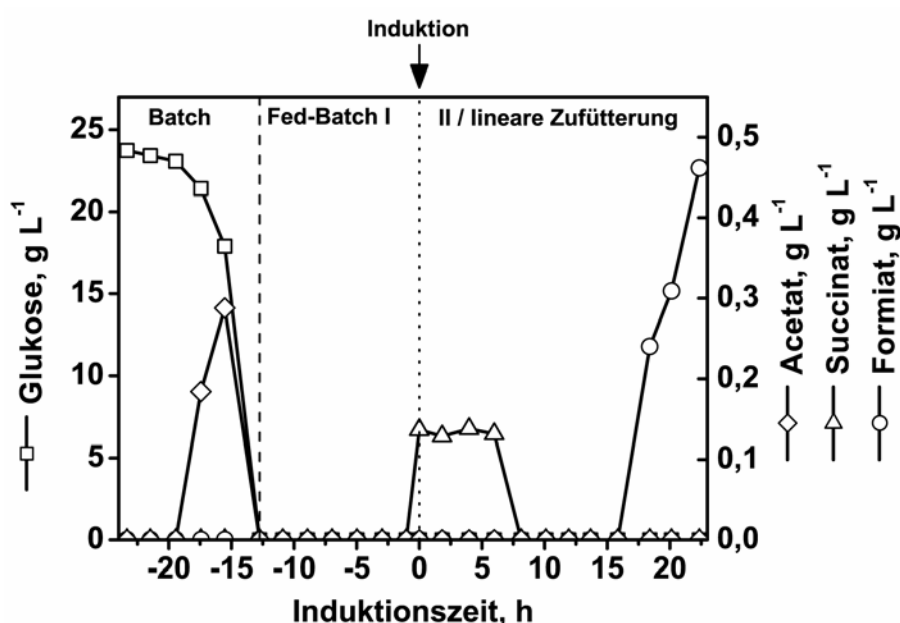


Abb. 5-6: Typische Glukose- und Metabolitkonzentration im Fermentationsüberstand während der Hochzelldichtekultivierung mit *E. coli* TG1:p λ TffH (HDF-A). Die Glukosekonzentration betrug zu Beginn der Kultivierung 24 g L^{-1} . Nach der Batchphase (10,6 h) wurde eine exponentielle Zufütterungsstrategie in der Fed-Batchphase (Fed-Batch I) gefahren (gestrichelte Linie). Die Induktion der rTffH Produktion (Fed-Batch II, gepunktete Linie) erfolgte nach 23,3 h Kultivierung durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 30 auf $39 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach der Induktion wurde die Zufütterung von exponentiell ($\mu_{\text{set}}=0,12 \text{ h}^{-1}$) auf linear ($12,8 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ h}^{-1}$) gestellt.

Mit der Induktion durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $39 \text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Fed-Batchphase II eingeleitet (Abb. 5-5). Analog zur ersten Fed-Batchphase wuchsen die Bakterien unter Kohlenstofflimitierung, wobei sich hier währenddessen Succinat und Formiat in geringen Konzentrationen im Kulturüberstand anreicherten (Abb. 5-6). Bis auf Formiat, welches in der späten Induktionsphase zu finden war, wurden die Metabolite wieder metabolisiert.

Um die rTfH-Bildungskinetik in Abhängigkeit von der Glukosedosierung zu untersuchen, wurden in der zweiten Fed-Batchphase zwei unterschiedliche Zufütterungsstrategien getestet. In der Kultivierung HDF-A wurde das exponentielle Zufütterungsprofil ($\mu_{\text{set}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$) auf ein lineares Zufütterungsprofil mit einer Zufütterungsrate von $F = 12,8 \text{ g}_{\text{glc}} \text{ h}^{-1}$ (entspricht der Rate, die zum Ende des Fed-Batch I vorlag) umgestellt. Als Folge der konstanten Glukosezufütterung wurde eine kontinuierliche Abnahme der Wachstumsrate μ beobachtet und nach ca. 10 h erfolgte keine weitere Biomassezunahme. Die durchschnittliche Wachstumsrate über diese ersten 10 h Induktion betrug $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$. Obwohl danach kein weiterer Zuwachs an Biotrockenmasse mehr erfolgte, nahm der CO_2 -Anteil im Abgas kontinuierlich zu. Dies wurde auch durch den Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{BTM/GLC}}$ deutlich, der in der Fed-Batchphase II ($0,05 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_{\text{glc}}^{-1}$) deutlich geringer war als in der Fed-Batchphase I ($0,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_{\text{glc}}^{-1}$). Über den Induktionszeitraum der ersten 10 h betrug dieser $0,1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_{\text{glc}}^{-1}$. Dies deutet auf einen erhöhten Energiebedarf der Zellen hin, der gegebenenfalls für den Erhaltungsstoffwechsel und die rTfH-Synthese benötigt wird. Am Ende der zweiten Fed-Batchphase (nach 22,4 h) und somit zu Kultivierungsende (nach 47,9 h) betrug die Biomasse $53,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$.

Im Gegensatz zur HDF-A wurde die Zufütterungsrate in der Kultivierung HDF-B während der Fed-Batchphase II nicht verändert, d. h. die Zufütterung erfolgte weiterhin exponentiell mit einer Rate von $\mu_{\text{set}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$. Obwohl durch die exponentielle Zufütterung eine höhere Glukosezufuhr vorlag, war der Kohlenstoff-Bedarf wie in der HDF-A nach Induktion der Zellen so gesteigert, dass auch in der HDF-B eine Abnahme der Wachstumsrate der Zellen nach ca. 6 h eintrat und sich so in der Fed-Batchphase II eine durchschnittliche Wachstumsrate von $\mu = 0,07 \text{ h}^{-1}$ ergab. Analog zur HDF-A nahm der CO_2 -Gehalt überproportional zur Biotrockenmasse zu und der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{BTM/GLC}}$ verringerte sich hier auf einen Wert von $0,1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_{\text{glc}}^{-1}$. Bei Kultivierungsende (36,8 h) lag eine Biotrockenmasse von $67,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ vor. Im gesamten Verlauf beider Hochzelldichtekultivierungen betrug der Respirationsquotient $1 \pm 0,02$. Eine C-Bilanzierung über den gesamten Kultivierungsverlauf ergab einen Wert von $100 \pm 2 \%$.

Der typische Verlauf der rTfH Anreicherung im Periplasma und im Kulturüberstand in den Hochzelldichtekultivierungen ist aufgrund des vergleichbaren Verlaufs exemplarisch am Beispiel der HDF-A gezeigt (Abb. 5-7). Die Bildungskinetik der rTfH wich in der Hochzelldichtekultivierung deutlich von der in der Batchkultivierung ab (Abb. 5-1b und Abb. 5-2b). Die Translokation der rTfH sowohl ins Periplasma als auch in den Kulturüberstand war

stark verzögert. Erst nach 12 h Induktion war eine erste rTfH Aktivität im Überstand zu beobachten. Der größte Teil davon akkumulierte im Periplasma. Nach 22,4 h Induktion wurden im Periplasma eine Aktivität von mehr als $70 \text{ U}_{p\text{NPP}} \text{ mL}^{-1}$ detektiert. In das Kultivierungsmedium wurden insgesamt nur 14 % der Gesamt-rTfH ($12 \text{ U}_{p\text{NPP}} \text{ mL}^{-1}$) sekretiert. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass unter den Bedingungen einer Hochzelldichtekultivierung rTfH anders als unter den Bedingungen der Batchkultivierung sekretiert.

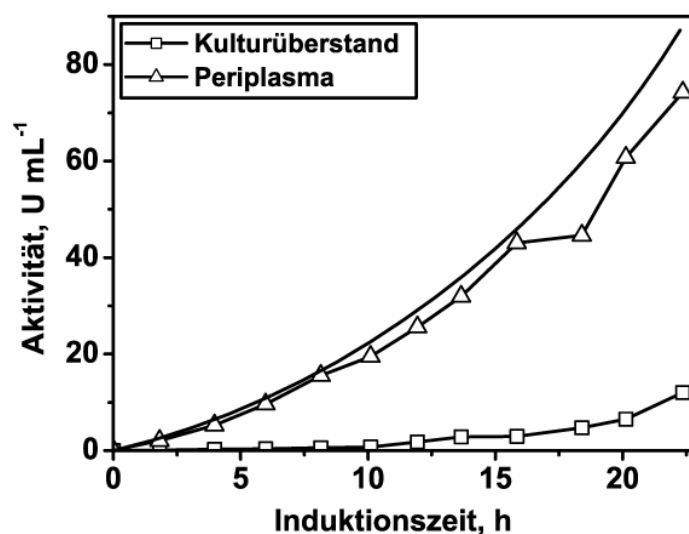


Abb. 5-7: Typischer Verlauf des rTfH Translokation ins Periplasma und in den Kulturüberstand nach Induktion durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 30 °C auf 39 °C. Die Produktionskinetik stammt aus der HDF-A, in der nach der Induktion die exponentielle Zufütterung auf lineares Zufütterungsprofil ($F=12,9 \text{ g}_{\text{glc}} \text{ h}^{-1}$) gesetzt wurde.

Trotz der geringen Translokation von rTfH in den Kulturüberstand belegen die Experimente mit SDS-Gelen, dass nach Induktion der rTfH Produktion eine kontinuierliche Freisetzung von Proteinen in den Kulturüberstand erfolgte (Abb. 5-8). So konnte wie bei der Batchkultivierung auch in der Hochzelldichtekultivierung das „dipeptide binding protein“ (DBP) nachgewiesen werden. Zudem zeigte die Analyse von N-terminalen Aminosäuresequenzen der rTfH (für die Analyse wurde aufgereinigtes Protein verwendet) am Kultivierungsende kein Enzym mit nicht abgetrenntem Signalpeptid OmpA. Allerdings waren auch hier wieder an den N-Termina der rTfH Aminosäurereste des OmpA Signalpeptids nachweisbar. Die in den SDS-Gelen zu erkennenden Proteinbanden scheinen somit periplasmatischen Ursprungs zu sein und sind nicht durch eine Zellyse freigesetzt.

Die fortwährende Zunahme der rTfH Aktivität im Periplasma und im Kulturüberstand über den gesamten Induktionszeitraum lässt vermuten, dass sich im Cytoplasma noch unprozessierte rTfH befand. Aus diesem Grunde wurde die rTfH Aktivität zum Ende der Hochzelldichtekultivierung in der löslichen Fraktion des Cytoplasmas gemessen. Nach 22,4 h Induktion wurde in der HDF-A eine Lipaseaktivität von $141 \cdot 10^3 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ L}^{-1}$ gefunden. Die ermittelte Lipaseaktivität konnte auf rTfH Aktivität zurückgeführt werden, da Aktivitätsmessungen im Cytoplasma zum Induktionszeitpunkt $t = 0$ keine Lipaseaktivität zeigten. Aktivitätsbestimmungen der unlöslichen Bestandteile des Cytoplasmas zeigten keine signifikanten Aktivitäten.

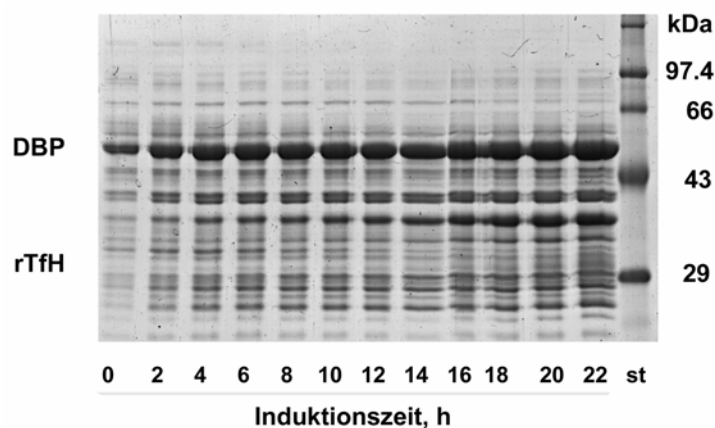


Abb. 5-8: SDS-Gel vom Kulturüberstand der Hochzelldichtekultivierung (HDF-A) über den gesamten Induktionszeitraum nach Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 30 °C auf 39 °C. Die Induktion der rTfH Produktion erfolgte nach 23,3 h Kultivierung. Nach der Induktion wurde das Zufütterungsprofil von exponentiell ($\mu_{\text{set}}=0,12 \text{ h}^{-1}$) auf linear ($12,8 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ h}^{-1}$) gesetzt. Der Proteinstandard ist mit st markiert.

In Tab. 5-2 sind die Prozessparameter der HDF-A und HDF-B sowie die rTfH Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen zusammengefasst. In der HDF-A wurden im Kulturüberstand und im Periplasma höhere volumetrische Ausbeuten ($\text{U}_{\text{pNPP}} \text{ L}^{-1}$) erzielt als in der HDF-B, wohingegen die volumetrischen Aktivitäten im Cytoplasma in der HDF-B etwas höher waren. Insgesamt wurden mit der HDF-A ($227,50 \cdot 10^3 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ L}^{-1}$) höhere Ausbeuten erreicht als mit der HDF-B ($213,59 \cdot 10^3 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ L}^{-1}$). Dies spiegelte sich auch in der spezifischen Aktivität ($\text{U}_{\text{pNPP}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$) wieder, die mit $4,28 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ in der HDF-A ca. 35 % höher war als in der HDF-B. Unter Einbeziehung der Induktionsdauer, die für die HDF-A 22,4 h und für die HDF-B 11,4 h betrug, ergab sich jedoch ein anderes Bild. Hier war in der HDF-B die volumetrische Produktivität ($\text{U}_{\text{pNPP}} (\text{Lh})^{-1}$) um ca. 90 % und die spezifische ($\text{U}_{\text{pNPP}} (\text{g}_{\text{BTM}} \text{ h})^{-1}$)

Produktivität um ca. 50 % höher als in der HDF-A. Somit führte die erhöhte Glukosedosierung aufgrund der exponentiellen Zufütterungsstrategie in der HDF-B zu einer besseren Volumen-Zeit-Ausbeute.

Tab. 5-2 rTffH Produktion in Hochzelldichtekultivierungen mit *E. coli* TG1:p λ TffH und linearem und exponentiellem Zufütterungsprofil nach erfolgter Induktion. Kultivierungsbedingungen: Glukoseanfangskonzentration in der Batchphase: 24 g L⁻¹; pH: 6,8; T=30 °C; T_{ind}=39 °C, Feed 1: $\mu_{\text{set}}=0,12 \text{ h}^{-1}$)

	HDF-A lineare Zufütterungsrate mit 12,8 g _{Glc} h ⁻¹	HDF-B exponentielle Zufütterungsrate mit $\mu_{\text{set}}=0,12 \text{ h}^{-1}$
Biomass (t _{ind}), g L ⁻¹	38,5	42
Biomasse (t _{final}), g L ⁻¹	53,2	67,8
Induktionsdauer, h	22,4	11,4
<u>Überstand</u>		
Vol. Aktivität, 10 ³ U _{pNPP} L ⁻¹	12,04	5,16
Spez. Aktivität, 10 ³ U _{pNPP} g _{BTM} ⁻¹	0,227	0,076
<u>Periplasma</u>		
Vol. Aktivität, 10 ³ U _{pNPP} L ⁻¹	74,22	51,69
Spez. Aktivität, 10 ³ U _{pNPP} g _{BTM} ⁻¹	1,395	0,762
<u>Cytoplasma</u>		
Vol. Aktivität, 10 ³ U _{pNPP} L ⁻¹	141,24	156,74
Spez. Aktivität, 10 ³ U _{pNPP} g _{BTM} ⁻¹	2,655	2,312
<u>Gesamt</u>		
Vol. Aktivität, 10 ³ U _{pNPP} L ⁻¹	227,50	213,59
Spez. Aktivität, 10 ³ U _{pNPP} g _{BTM} ⁻¹	4,28	3,15
Vol. Produktivität, 10 ³ U _{pNPP} (Lh) ⁻¹	10,156	18,736
Spez. Produktivität, 10 ³ U _{pNPP} (g _{BTM} h) ⁻¹	0,19	0,28

5.1.3 Reinigung der rTfH

Zur Reinigung der rTfH wurden grundsätzlich zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollte eine rTfH geringerer Reinheit aus Fraktionen lysierter Zellen hergestellt werden, die eine vor dem Hintergrund einer technischen Produktion kostengünstige Möglichkeit bietet, eine rTfH mit ausreichend hoher Aktivität und Stabilität zu erzeugen. Zum anderen sollte ein Verfahren zur Gewinnung von rTfH mit sehr hoher Reinheit erarbeitet werden, bei der das C-terminale His₆-Tag am Protein genutzt werden sollte. Das aufgereinigte Enzym sollte dann für mechanistische Studien zum Adsorptionsverhalten und zur Abbaukinetik eingesetzt werden und außerdem als Basis für eine Röntgenstrukturanalyse dienen.

5.1.3.1 rTfH geringer Reinheit

Für das hier dargestellte Reinigungsschema wurden *E. coli* TG1:pλTfH Zellen aus der Hochzelldichtekultivierung HDF-B verwendet. Aktivitätsmessungen der löslichen cytoplasmatischen Fraktion hatten gezeigt, dass ein Großteil der rTfH nicht in das Periplasma überführt wurde (Tab. 5-2). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein einfaches Reinigungsschema entwickelt, um cytoplasmatisch lokalisierte rTfH zu gewinnen. Zudem wurde die hohe Hitzestabilität der rTfH genutzt, um Fremdproteine abzutrennen und den Reinigungsgrad zu erhöhen (Kap. 5.2.2.1) Für die Aufreinigung der rTfH wurde ein zweistufiges Verfahren, bestehend aus dem Ultraschallaufschluss zur Freisetzung cytoplasmatischer Proteine und einer sich anschließenden Hitzebehandlung, erarbeitet. Dabei wurden zwei Prozesswege betrachtet, welche im Folgenden näher erläutert werden (Abb. 5-9).

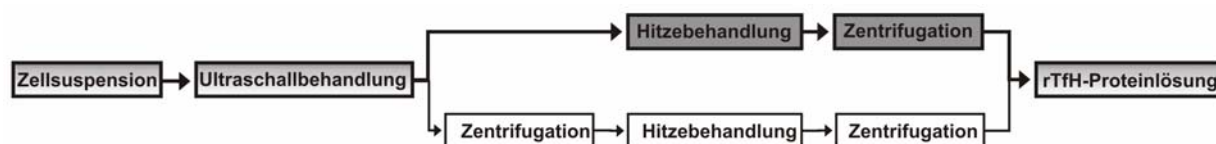


Abb. 5-9: Aufreinigungsverfahren zur Gewinnung von rTfH geringerer Reinheit

In ersten Tests wurden die optimalen Bedingungen für einen Ultraschallaufschluss der *E. coli* TG1:pλTfH Zellen bestimmt. Dazu wurden 75 mg Biomasse (HDF-B), was einer Biotrockenmasse von 13 mg entspricht, in 2 mL PBS Puffer aufgenommen und mit Ultraschall aufgeschlossen. Dabei wurden sowohl die Dauer als auch die Anzahl der Ultraschallpulse und die darauffolgenden Pausen variiert. Die besten Resultate wurden mit

drei aufeinanderfolgenden 30 s langen Pulsen mit jeweils einer 2 minütigen Unterbrechung erzielt. Nach Zellaufschluss und Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation wurde im Überstand eine Aktivität von $26,52 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ mL}^{-1}$ für die rTfH bestimmt. Dies entsprach einer spezifischen Hydrolaseaktivität von $4,1 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Die Proteinkonzentration im Zelllysat betrug $2,57 \text{ mg mL}^{-1}$ mit einem rTfH-Anteil von ca. 2 % (w/w) (spezifische Aktivität der hochreinen rTfH: $445 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ mg}^{-1}$). Im Vergleich zur chemischen Aufschlussmethode mit einer Detergenzienlösung (Kap. 4.5.1.2), welche zur Bestimmung cytoplasmatisch lokalisierter rTfH in der Hochzelldichtekultivierung ($3,1 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$) verwendet wurde, war die spezifische Aktivität beim Ultraschallaufschluss um einen Faktor von 1,3 höher.

Tab. 5-3 Zusammenfassung der Reinigungsschritte zur Erlangung von rTfH mit geringer Reinheit. Für das Reinigungsprofil zur Gewinnung von rTfH mit geringer Reinheit wurde 75 mg (HDF-B) Biomasse in 2 mL PBS aufgenommen.

Reinigungsschritte	Aktivität, $\text{U}_{\text{pNPP}} \text{ L}^{-1}$	Protein, mg L^{-1}	Spez. Aktivität, $\text{U}_{\text{pNPP}} \text{ mg}^{-1}$	Reinigungs- faktor	Ausbeute, %
Ultraschall	26,52	2,57	10,32	1	100
Hitzebehandlung	22,51	1,47	15,31	1,5	85
Ultraschall / Hitzebehandlung ^a	28,89	1,41	20,5	—	—

^a Zelllysat wurde direkt nach dem Ultraschallaufschluss hitzebehandelt.

In einem zweiten Schritt wurde das erhaltene Zelllysat hitzebehandelt. Dabei wurden zwei mögliche Aufreinigungsprozesse betrachtet, wobei das erhaltene Zelllysat nach dem Ultraschallaufschluss einmal vor (Abb. 5-9, oberer Prozessweg) und einmal nach (Abb. 5-9, unterer Prozessweg) der Abtrennung der Zelltrümmer bei 55°C für 10 min inkubiert wurde. Nach einem abschließendem Zentrifugationsschritt wurden die Aktivitäten in den jeweiligen Überständen bestimmt. Die Hitzebehandlung direkt nach dem Ultraschallaufschluss (ohne Abtrennung der Zelltrümmer, oberer Prozessweg) der Zellen erzielte um ca. 25 % höhere rTfH Ausbeuten. In Tab. 5-3 sind die Ergebnisse der Reinigung nochmals zusammengefasst. Unter Anwendung des hier vorgestellten Reinigungsschemas (Ultraschallaufschluss \Rightarrow Hitzebehandlung \Rightarrow Zentrifugation) wurde eine Proteinlösung gewonnen, die unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der hochreinen rTfH einen rTfH-Gehalt von ca. 4,6 % (w/w) besitzt. Die so erhaltene rTfH-Lösung kann über mehrere Wochen bei -20°C ohne signifikante Aktivitätsverluste gelagert werden.

5.1.3.2 rTfH hoher Reinheit

Im Folgenden ist das Aufreinigungsverfahren beispielhaft für die periplasmatische Proteinfraktion mit *E. coli* TG1:p λ TfH Zellen aus der HDF-A dargestellt. Für die Gewinnung der periplasmatischen Proteine wurden die Zellen zunächst osmotisch geschockt (Kap. 4.5.1.1). Nach Abtrennung der Zelltrümmer ergab sich in der Proteinlösung eine Aktivität von $8,57 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ mL}^{-1}$. Die Aufreinigung erfolgte in einem ersten Schritt durch Affinitätschromatographie (Kap. 4.5.3.1) mit Ni^{2+} -aktivierter Sepharose. Die Elution wurde mittels eines linearen Imidazolgradienten durchgeführt (Abb. 5-10a). Bei einer Imidazolkonzentration von etwa 200 mM wurde die erste rTfH-Aktivität im Eluat beobachtet. Durch diesen Chromatographieschritt wurde ein Aufreinigungsfaktor von ca. 30 % bei einer Aktivitätsausbeute von 71 % erreicht. Die spezifische Aktivität in den vereinigten Fraktionen betrug $436 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ mg}^{-1}$.

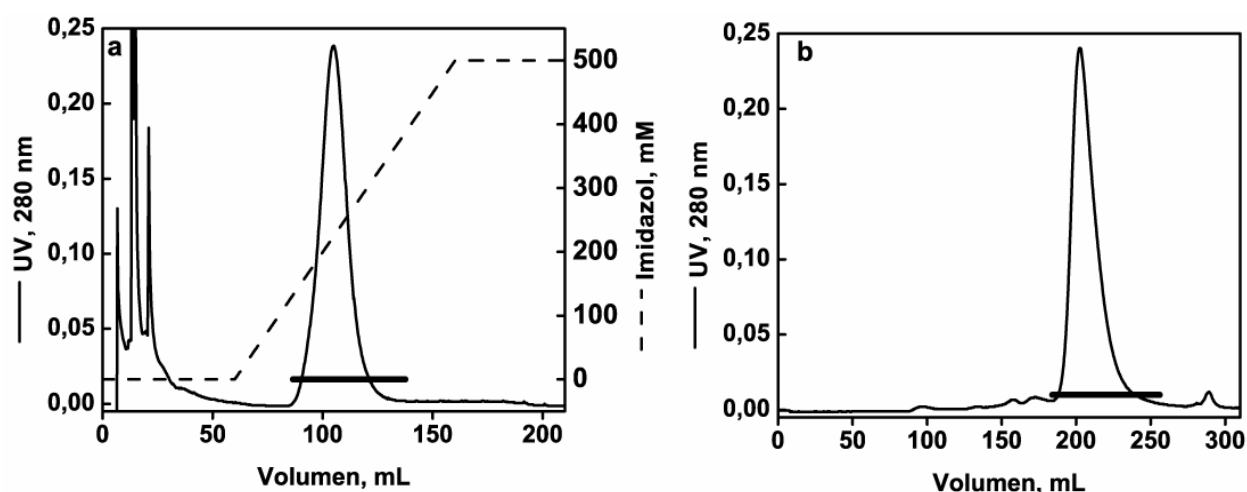


Abb. 5-10: Reinigung der rTfH aus einer Periplasmafraktion. Die *E. coli* TG1:p λ TfH Zellen stammen aus der Hochzelldichtedichtekultivierung HDF-A. Die gesammelten Fraktionen sind mit einem waagerechten Balken dargestellt. **a:** Ni^{2+} -Affinitätschromatographie, Säule: Startpuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol) Elutionspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol) **b:** Gelfiltration Säule: Superdex 75 prep grade, Startpuffer: 0,9 % NaCl.

Um weitere Proteinverunreinigungen zu entfernen und die hohen NaCl- sowie Imidazolkonzentrationen zu senken, schloss sich der Metall-Chelat-Chromatographie eine Gelfiltration an (Abb. 5-10). Als Elutionsmittel wurde 0,9 %ige NaCl-Lösung verwendet. Nach der Gelfiltration wurde in den vereinigten aktiven Fraktionen eine Aktivität von $4,89 \text{ U}_{\text{pNPP}} \text{ mL}^{-1}$ detektiert. Die spezifische Aktivität der hochreinen rTfH gegenüber *p*-

Nitrophenylpalmitat ($p\text{NPP}$) betrug $445 \text{ U}_{p\text{NPP}} \text{ mg}^{-1}$. Bezogen auf die periplasmatische Proteinfraction wurde ein Aufreinigungsfaktor von 30 und eine Ausbeute von 57 % erzielt. In Tab. 5-4 sind die Ergebnisse des Aufreinigungsverfahrens nochmals zusammenfassend dargestellt.

Tab. 5-4 Zusammenfassung der Reinigungsschritte zur Erlangung von rTfH mit hoher Reinheit. Die in der Tabelle dargestellten Aktivitäten wurden im Falle der rTfH hoher Reinheit aus 37 g Biomasse (HDF-A) nach osmotischem Schock in einem Liter Puffer gewonnen.

Reinigungsschritte	Aktivität, $\text{U}_{p\text{NPP}} \text{ L}^{-1}$	Protein, mg L^{-1}	Spez. Aktivität, $\text{U}_{p\text{NPP}} \text{ mg}^{-1}$	Reinigungs- faktor	Ausbeute, %
Periplasmatische Proteinfraction	8570	587	15	1	100
Ni^{2+} - Affinitäts- chromatographie	6530	15	436	29	71
Gelfiltration	4890	11	445	30	57

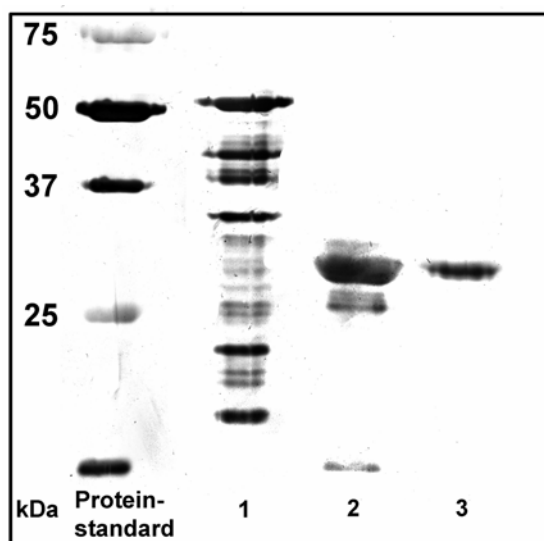


Abb. 5-11: Überprüfung der rTfH-Reinigung mit Hilfe der SDS-Gelanalyse. Die *E. coli* TG1:p λ TfH Zellen stammen aus der Hochzelldichtekultivierung HDF-A. **Spur 1:** Periplasmatische Fraktion nach osmotischem Schock. **Spur 2:** vereinte Fraktionen nach der Affinitätschromatographie. **Spur 3:** vereinte Fraktionen nach der Gelfiltration.

In Abb. 5-11 ist der Verlauf der Proteinaufreinigung mittels der SDS-Gelanalyse dokumentiert. In Folge des osmotischen Schocks lagen in der periplasmatischen Proteinfraction neben der rTfH eine Vielzahl weiterer periplasmatischer Proteine vor, die aber durch die Metall-Chelat-Chromatographie bis auf geringe Proteinverunreinigungen abgetrennt

wurden. Die abschließende Gelfiltration führte dann zu einer gelelektrophoretisch sauberen rTfH. Der Aufreinigungsfaktor im zweiten Chromatographieschritt korrelierte mit der nur noch geringen Verunreinigung vor dieser Aufreinigungsstufe (Tab. 5-4).

5.1.4 Zusammenfassung der rTfH Produktion in *E. coli* TG1: p λ TfH

Mit der Entwicklung des rekombinanten *E. coli* TG1:p λ TfH Stammes und neuer Kultivierungsstrategien wurde eine Alternative zur ineffizienten Produktion der TfH direkt aus dem Wildstamm *Thermobifida fusca* etabliert.

Im Vergleich zur Kultivierung mit dem Wildstamm *T. fusca* wurden die volumetrischen TfH-Aktivitäten [Gouda et al. 2002] (volumetrische Aktivitäten angegeben in $U_{PCL} \text{ mL}^{-1}$ in $U_{pNPP} \text{ mL}^{-1}$ umgerechnet, siehe Anhang Abb. 7-3 und Tab. 7-1) in den Batchkultivierungen mit *E. coli* TG1:p λ TfH nahezu verdoppelt. Im Hochzelllichtverfahren wurde die rTfH-Produktion um den Faktor 15, unter Berücksichtigung der cytoplasmatischen Proteinfraction sogar um den Faktor 50 erhöht. Bezogen auf die in der *T. fusca* Kultivierung erzielten volumetrischen Produktivität, konnten diese in den *E. coli* TG1:p λ TfH Kultivierungen um einen Faktor von mehr als 100 erhöht werden.

Die erzielten rTfH Aktivitäten zeigen, dass die rTfH-Produktion mit dem rekombinanten *E. coli* TG1:p λ TfH Stamm geeignet ist, um hohe Mengen an Hydrolase zu synthetisieren, welche für technische Prozesse, beispielsweise in der Textilindustrie oder im Recycling von Polyestern, Anwendung finden könnte. Ein einfaches Aufarbeitungsverfahren (Kap. 5.1.3.1), welches einen stabilen und lagerungsfähigen rTfH-Rohextrakt mit einem rTfH Gehalt von etwa 5 % (w/w) der Gesamtproteinmenge lieferte, stellt einen weiteren Vorteil für eine mögliche technische Anwendung dar.

Mit der Klonierung des *his6*-Tags an das C-terminale Ende des *bta1*-Gens wurde im Vergleich zu der Wildstamm-TfH die Aufarbeitung des Enzyms deutlich verbessert. Die Ausbeute von 14 % wTfH [Kleeberg et al. 2005] ließ sich auf 57 % rTfH steigern, indem auf einen verlustreichen Ausfällungsschritt mit Ammoniumsulfat verzichtet werden konnte. Des Weiteren wurde die Proteinaufarbeitung um einen Reinigungsschritt auf zwei Reinigungsstufen verkürzt. Dies liefert ein Enzym mit einer spezifischen Enzymaktivität von $445 U_{pNPP} \text{ mg}^{-1}$ bei einem Aufreinigungsfaktor von 30. Auf Basis der ermittelten spezifischen rTfH-Aktivität ließen sich somit in Hochzelllichtkultivierungen mit *E. coli* TG1:p λ TfH etwa $0,5 \text{ g L}^{-1}$ synthetisiertes rTfH gewinnen.

Im Vergleich zur Batchkultivierung wurden in den Hochzelldichtekultivierungen im Kulturüberstand und Periplasma ca. 10fach höhere rTfh-Aktivitäten gemessen. Überraschenderweise waren die spezifischen Produktivitäten im Vergleich zur Batchkultivierung im synthetischen Kulturmedium um das doppelte erhöht und unter Einbeziehung der cytoplasmatisch lokalisierten rTfh sogar in der gleichen Größenordnung zu den spezifischen Produktivitäten, die im LB-Medium erzielt wurden. Normalerweise würde man bei gleicher Medienzusammensetzung vergleichbare spezifische Produktivitäten erwarten. Kurze Sequenzunterschiede am N-Terminus der rTfh-Aminosäuresequenz, die sich durch die uneinheitliche Hydrolyse des Signalpeptids OmpA durch die Signalpeptidase ergeben, könnten jedoch die beobachteten Aktivitätsunterschiede hervorrufen. Zum anderen weisen die hohen cytosolischen rTfh-Aktivitäten der Hochzelldichtekultivierungen darauf hin, dass sich unter Umständen nach Beendigung der Batchkultivierungen noch rTfh, welche nicht ins Periplasma sekretiert wurde, im Cytoplasma befindet und daher nicht in die Berechnung der spezifischen Produktivitäten einfließen konnte. Leider wurde auf die Bestimmung cytoplasmatisch lokalisierter rTfh in den Batchkulturen aufgrund der zu beobachtenden Produktionskinetik verzichtet. Zukünftige Experimente werden klären müssen, wie es zu solchen Unterschieden kommen kann.

Sowohl in den Batchkultivierungen als auch in den Hochzelldichtekultivierungen wurde nach der Translokation der rTfh ins Periplasma ein Transport in das Kultivierungsmedium beobachtet. Der erste Translokationsschritt, der Transport vom Cytoplasma in den periplasmatischen Raum, erfolgte dabei durch den Sec-abhängigen Transportweg (Kap. 3.6.3). Die Produktionskinetiken der jeweiligen Kultivierungsstrategien lassen vermuten, dass der Sec-abhängige Transport im Vergleich zur Genexpression der rTfh der geschwindigkeitslimitierende Schritt ist. Diese Vermutung wird durch die hohen cytoplasmatischen rTfh-Aktivitäten, die in den Zellen nach der Hochzelldichtekultivierung gemessen wurden, gestützt. Unter der Annahme, dass der Sec-abhängige Transport für die rTfh Translokation verantwortlich ist und dieses Enzym auch im ungefalteten Zustand ins Periplasma sezerniert, bestände unter Umständen die Möglichkeit, dass bei einer Überlastung des Transportweges nicht genügend SecB Chaperone, welche neben weiteren Chaperonen die rTfh im ungefalteten Zustand behalten, im Cytoplasma verfügbar sind [Mori und Ito 2001]. Als Folge dessen würde es bereits zu einer Proteinfaltung oder -aggregation im Cytoplasma kommen. Somit könnte die rTfh nicht mehr ins Periplasma transportiert werden und verbliebe im Cytoplasma. Die hohen Aktivitäten in der löslichen Cytoplasmafraktion nach erfolgtem Zellaufschluss der Zellen aus der Hochzelldichtekultivierung stützen eine solche

Hypothese. Im Falle einer Proteinaggregation müssten „Inclusion Bodies“ gebildet worden sein, was die Experimente jedoch nicht belegen. Allerdings kann diese Vermutung aufgrund der hier vorgenommenen Untersuchungen nicht bewiesen werden, da eine Faltung der rTfH auch nach dem Zellaufschluss in der Pufferlösung spontan stattfinden kann. Hier wären unter Umständen andere Chaperone involviert, die eine Faltung der rTfH verhindern würden. Ein Beispiel wäre DnaK, welches auch unter Hitzestressbedingungen exprimiert wird [Mayer und Bukau 2005].

Der zweite beobachtete Translokationsweg umfasst die Freisetzung der rTfH vom Periplasma in das Kulturmedium. Versuche, bei denen die N-terminalen Aminosäuresequenzen der rTfH sequenziert wurden, belegen, dass zum Kultivierungsende keine unprozessierte rTfH mit vollständiger OmpA-Signalsequenz nachweisbar waren. Dies lässt vermuten, dass die im Kulturmedium vorhandene rTfH periplasmatischen Ursprungs ist und entweder mittels eines aktiven oder passiven Transportvorganges die äußere Zellmembran passiert. Allgemein wird angenommen, dass *E. coli* Laborstämme unter normalen Wachstumsbedingungen kaum Proteine über die äußere Zellmembran ins extrazelluläre Medium transportieren [Zhang et al. 2006]. Allerdings ist die „Leakage“ der äußeren Zellmembran ein bekanntes Phänomen und wurde bereits in den unterschiedlichsten Kultivierungen beobachtet [Shokri et al. 2002, Zhang et al. 2006, Rinas und Hoffmann 2004] und auch in einigen Review-Artikeln näher beleuchtet [Shokri et al. 2003, Choi und Lee 2004]. Eine Permeabilität der äußeren Zellmembran ließe sich unter anderem auf die Medienzusammensetzung, Wachstumsraten, Zelldichten und einer Veränderung in den Kultivierungsbedingungen zurückführen. Beispielsweise führen hohe Mg^{2+} - und Ca^{2+} - Ionenkonzentrationen zu erhöhter Permeabilität der äußeren Zellmembran [Vaara 1992]. Die Erhöhung der Kultivierungstemperatur bewirkt eine Veränderung der Membranpermeabilität und –fluidität durch veränderte Lipidzusammensetzungen. Dieser Aspekt wurde eingehend in kontinuierlichen Kulturen mit *E.coli* untersucht. Hierbei wurde eine erhöhte Permeabilität der äußeren Zellmembran bei hohen Wachstumsraten beobachtet [Shokri et al. 2002]. Rinas und Hoffmann [2004] untersuchen die „Leakage“ der äußeren Zellmembran in rekombinanten und nicht rekombinanten *E. coli* Zellen während der Hochzelldichtekultivierung. Die Autoren vermuten, dass sich die Sekretion von periplasmatisch lokalisierten Proteinen auf Stressfaktoren wie beispielsweise auf eine Temperaturerhöhung zurückführen lassen könnte.

In den Batchkultivierungen mit synthetischem Medium (Kap. 5.1.1.3) wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Freisetzung von rTfH in den Kulturüberstand wachstumsgekoppelt ist. Shokri et al., [2002] der ähnliche Beobachtungen machte, führt dieses auf verschiedene

Lipidzusammensetzungen der äußeren Zellwand zurück, die je nach Wachstumsrate variieren. Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass während des Zellwachstums und somit auch bei der Murein- und Lipopolysaccharidbiosynthese temporäre Öffnungen unvermeidbar sind [Neidhardt et al. 1990] und es daher zu einer Freisetzung von Proteinen periplasmatischen Ursprungs kommen könnte. Weiterhin kann eine Vesikelbildung und Fragmentierung der äußeren Zellmembran während der exponentiellen Wachstumsphase auftreten, was möglicherweise auf ein Ungleichgewicht der Murein- und Lipopolysaccharidbiosynthese zurückgeführt werden kann [Hoekstra et al. 1976, Wensink und Witholt 1981].

Im Gegensatz zu den Batchkultivierungen reicherte sich rTfH in den Hochzelldichtekultivierungen vermehrt im Cytoplasma und Periplasma an. Bei einer Induktionsdauer von 11 h waren nur 5 % (HDF-A) bzw. 10 % (HDF-B) der rTfH vom Periplasma in den Kulturüberstand migriert (Abb. 5-7 und Tab. 5-2). Aufgrund der exponentiellen Zufütterungsrate war die Wachstumsrate in der HDF-B wie erwartet höher als in HDF-A und stützt die Theorie, dass die Freisetzung periplasmatisch lokalisierter rTfH wohl wachstumsgekoppelt ist.

Der Sekretionsmechanismus, der zur Anreicherung der rTfH im Kulturmedium führt, ist bisher noch nicht geklärt. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen vermuten, dass der Transport periplasmatisch lokalisierter rTfH in den Kulturüberstand wachstumsgekoppelt ist und somit hohe Freisetzungsraten bei hohen Wachstumsraten zu erwarten wären. Zur Klärung dieser Hypothese sind weitere Untersuchungen zum Transportverhalten der *E. coli* Zellen nötig, um neue Strategien zu entwickeln, die eine optimierte Translokation in das Kulturmedium ermöglichen würden.

5.2 Vergleichende Untersuchungen zum Abbaumechanismus an Polyestern

In einem weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die rTfH in systematischen Untersuchungen besonders in Bezug auf ihre polyesterabbauenden Eigenschaften eingehend charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden im Vorfeld dieser systematischen Untersuchungen einige charakteristische Merkmale der rTfH wie zum Beispiel Temperaturoptimum, Temperaturstabilität und Grenzflächenaktivierung untersucht. Dazu sollte die rekombinant produzierte rTfH mit zwei weiteren polyesterspaltenden Enzymen, einer Lipase aus *Pseudomonas spec.* (PsL) und einer dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 aus *Paucimonas lemoignei*, vergleichend charakterisiert werden. PsL wurde als Modellenzym für Lipasen ausgewählt, da diese gute polyesterabbauende Eigenschaften gegenüber einem breiten Spektrum an polymeren Materialien aufweist und bereits eine Vielzahl an Daten über die Polyesterabbauereigenschaften derselben verfügbar sind [Marten et al. 2003, 2005]. PhaZ5 hingegen stellt einen typischen Vertreter der Gruppe der dP(3HB)-Depolymerasen dar [Jendrossek et al. 1995]. Aufgrund der hohen Substratspezifität der dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 gegenüber dem natürlichen Polyester dP(3HB) wurde dieses Enzym weitestgehend nur für systematische Untersuchungen zum Abbau von dP(3HB) verwendet.

5.2.1 Enzymformulierungen

Auf den folgenden Seiten werden wesentliche Merkmale der verwendeten Enzymformulierungen vorgestellt. In Abb. 5-12 ist die Reinheit der jeweiligen Enzymformulierungen durch ein SDS-Gel dargestellt. Zudem ist der isoelektrische Punkt der jeweiligen Hydrolasen angegeben.

Rekombinant produzierte TfH (rTfH)

Für die hier in dieser Arbeit untersuchten TfH-Eigenschaften wurde die in *E. coli* TG1:pλTfH überexprimierte rTfH hoher Reinheit verwendet (Kap. 5.1.3.2). Neben der rekombinant synthetisierten rTfH-Präparation sind zwei weitere Prozessstrategien zur Produktion von TfH mit dem Wildstamm *Thermobifida fusca* bekannt, die im Weiteren als wTfH-Präparationen bezeichnet werden. In Tab. 5-5 sind die spezifischen Aktivitäten der Enzympräparationen gegenüber ausgewählten Substraten und deren Reinigungsprofile nochmals zusammengefasst. Die hoch aufgereinigte wTfH Präparation von Kleeberg et al. [2005] zeigt eine um den Faktor

von 4 geringere spezifische Aktivität gegenüber dem Triglycerid Tributyrin als die hochreine rekombinante TfH. Diese Diskrepanz zwischen den spezifischen Aktivitäten kann nicht hinreichend erklärt werden. rTfH und wTfH unterscheiden sich in ihren N- sowie C-Termina der Aminosäuresequenz. Am C-Terminus der rTfH Aminosäuresequenz befindet sich ein His₆-Tag und mittels N-terminaler Aminosäuresequenzierung wurde zudem gezeigt, dass sich an den N-Termina der rTfH noch Aminosäurereste des Signalpeptids OmpA befinden (Kap. 5.1.1.3). Ein Einfluss der veränderten Aminosäuresequenztermina auf die Enzymkonformation und somit auch der Enzymaktivität der rTfH kann nicht ausgeschlossen werden.

Tab. 5-5: Die TfH-Enzymlösungen aus unterschiedlichen Präparationen in unterschiedlicher Reinheit mit den entsprechenden Aufarbeitungsprofilen

	Produktionsstamm	Reinigungsprofil	Reinigungsfaktor / Ausbeute	Spez. Aktivität, U mg ⁻¹		Aktivitätsunterschied, % ^a
				pNPP	Tributyrin	
rTfH	<i>E. coli</i> TG1: pλTfH	<ul style="list-style-type: none"> • Osmotischer Schock (zur Freisetzung periplasmatischer Proteine) • Ni-Affinitätschromatographie • Gelfiltration 	30 / 57 %	445	1390	100
wTfH (Kleeberg et al. [2005])	<i>T. fusca</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ammoniumsulfatfällung (aus dem Kulturüberstand) • Kationenaustauschchromatographie • Hydrophobe Interaktionschromatographie 	109 / 14 %	—	360	26
wTfH (Gouda et al. [2002])	<i>T. fusca</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ultrafiltration (des Kulturüberstandes) • Lyophilisation 	1,2 / 45 %	26	—	6

^a Spezifische Aktivität von rTfH wurde 100 % gesetzt. Die spezifischen Aktivitäten der wTfH-Präparationen wurden entsprechend angepasst.

Es sind Beispiele aus der Literatur bekannt, bei denen Aktivitätsunterschiede zwischen dem homolog und heterolog synthetisierten Enzym nachgewiesen wurden [Rua et al. 1997, Miller et al. 1992]. So sind die spezifischen Enzymaktivitäten der homologen Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus* deutlich von der mit *E. coli* rekombinant synthetisierten verschieden. Rua et al. [1997] vermuteten, dass sich homolog bzw. heterolog produzierte Lipasen gegebenenfalls in ihrer Konformation unterscheiden oder dass sich aufgrund des niedrigen Expressionslevels der homolog synthetisierten Lipase der Anteil an inaktiver Lipase auf die spezifische Aktivität verringernd auswirken könnte.

Die geringe spezifische Aktivität der wTfH-Enzymlösung aus einer Präparation von Gouda et

al. [Gouda et al. 2002] kann auf die hohe Verunreinigung mit Fremdprotein zurückgeführt werden, da hier lediglich der Kulturüberstand mittels Ultrafiltration eingeengt wurde.

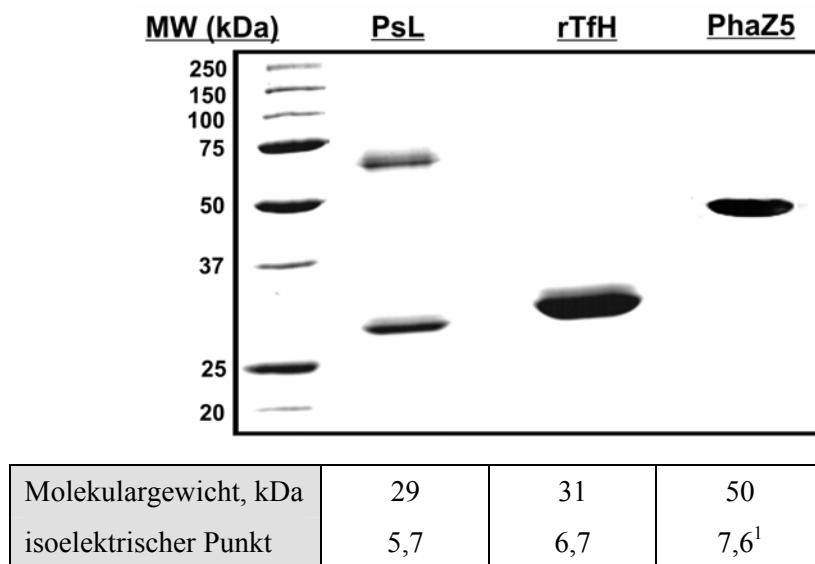


Abb. 5-12: SDS-Gel der in der Arbeit verwendeten Enzymformulierungen. Die aufgetragene Gesamtproteinmenge pro Spur betrug 2 µg. Die Proteine wurden mittels einer Coomassie-Färbung angefärbt. **Spur 1:** kommerziell erworbene Lipase aus *Pseudomonas species* (Fluka, USA). **Spur 2:** Hydrolase rTfH hoher Reinheit aus der Hochzelldecktekkultivierung (HDF-A) mit *E. coli* TG1: pλTfH. **Spur 3:** dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 aus *Pseudomonas lemoignei* [Jendrossek et al. 1995]. Aus der Tabelle sind das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt der jeweiligen Enzyme angegeben. ¹Daten sind aus Jendrossek und Handrick [2002] entnommen.

Die Lipase aus Pseudomonas species (PsL)

Als Vertreter einer typischen Lipase wurde die kommerziell erworbene Lipase PsL aus dem Mikroorganismus *Pseudomonas spec.* verwendet (Kap. 4.8.1). In der Abb. 5-12 ist die Reinheit der PsL- Enzymformulierung mit der von rTfH und PhaZ5 mit Hilfe eines SDS-Gels vergleichend dargestellt. Neben der PsL Proteinbande bei 29 kDa ist eine zweite gleich starke Proteinbande bei 66 kDa zu erkennen (Spur 1). Diese Proteinbande wurde Rinderserumalbumin (BSA) zugeordnet, welche wohl zur Stabilisierung der Enzymformulierung zugesetzt wurde [Welzel 2003]. Es wird davon ausgegangen, dass die Anwesenheit von BSA die Aktivität der PsL nicht beeinflusst. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass eine Erhöhung der BSA-Konzentration in der PsL-Enzymformulierung zu keiner signifikanten Veränderung des PsL-Adsorptionsverhaltens auf der Polyesteroberfläche führt [Sieblitz 2006]. Unter dieser Annahme sind die im folgenden angegebenen

Enzymkonzentrationen bzw. Enzymmengen auf den Gehalt an aktivem Enzym in der PsL-Formulierung bezogen, der aus der gelchromatographischen Analyse mit einem Gehalt von 50 % der Gesamtproteinmenge angesetzt wird.

5.2.1.1 Die dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 aus *Paucimonas lemoignei*

Als Vertreter der dP(3HB)-Depolymerasen wird PhaZ5 aus dem Mikroorganismus *Paucimonas lemoignei* verwendet. PhaZ5 wurde freundlicherweise aus dem Labor von Prof. Dieter Jendrossek (Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Die gelchromatographische Auftrennung der Probe zeigt eine Gelbande bei 50 kDa (Abb. 5-12). In den sich anschließenden Untersuchungen wurde davon ausgegangen, dass sich keine weiteren Proteinverunreinigungen in der Lösung befinden. Das aus der Aminosäuresequenz ermittelte Molekulargewicht der PhaZ5 beträgt 42,2 kDa. Die sich daraus ergebene Gewichts Differenz von 800 Da ist auf eine Glykolysierung der PhaZ5 durch *P. lemoignei* zurückführen [Braaz et al. 2002].

5.2.2 Allgemeine biochemische Charakterisierung

5.2.2.1 Temperaturoptimum und –stabilität

Für den enzymatischen Abbau von Polyestern sind Enzyme von Vorteil, die im thermophilen bzw. im extrem thermophilen Temperaturbereich hohe katalytische Aktivitäten aufweisen. So zeigte beispielsweise Marten et al. [2005, 2003], dass die Annäherung der Abbautemperatur an den Schmelzpunkt semikristalliner Polyester auf weniger als 30 °C eine deutliche Erhöhung der Abbaurate bewirkt. Am Beispiel des bioabbaubaren Polyesters Polycaprolacton mit einem Polyesterschmelzpunkt von 60 °C würde dies bedeuten, dass hydrolytische Enzyme mit einem Temperaturoptimum höher als 30 °C im Vergleich zu Hydrolasen mit entsprechend geringerem Temperaturoptimum den Bioabbau wahrscheinlich signifikant verstärken würden.

Die Temperaturoptima der Hydrolasen PsL und rTfH wurden in Gegenwart des kurzkettigen wasserunlöslichen Triglycerides Triolein bestimmt. In Abb. 5-13 sind die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Beiden Kurvenverläufen sind der langsame Anstieg, ein Aktivitätsoptimum (T_{opt}) im thermophilen Temperaturbereich und der starke Abfall direkt hinter dem Optimum gemein. Die starke Abnahme der Enzymaktivität nach Überschreiten des T_{opt} ist auf eine mögliche Denaturierung des Enzyms zurückzuführen. PsL zeigte höchste katalytische Aktivität bei 60-65 °C, rTfH bei

55 °C (Abb. 5-13). Auffallend ist der Aktivitätsunterschied beider Enzyme gegenüber Triolein. Im Optimumsbereich erfolgte die Hydrolyse von Triolein mit PsL mit einer spezifischen Aktivität von $80 \mu\text{mol (mg min)}^{-1}$ um den Faktor von etwa 4 schneller. Sowohl PsL als auch rTfH sind demnach in die Gruppe der thermophilen Lipasen bzw. Hydrolasen einzuordnen. Auf Basis der von Marten et al. [2005, 2003] formulierten Abhängigkeit der Polyesterabbaurate vom Polyesterschmelzpunkt, wären so PsL und rTfH aufgrund ihrer thermophilen Enzymeigenschaften bei Temperaturen von 50 bis 60 °C einsetzbar und in der Lage natürliche und synthetischen Polyestern mit einem Polyesterschmelzpunkt von bis zu 90 °C in hohem Maße zu hydrolysieren.

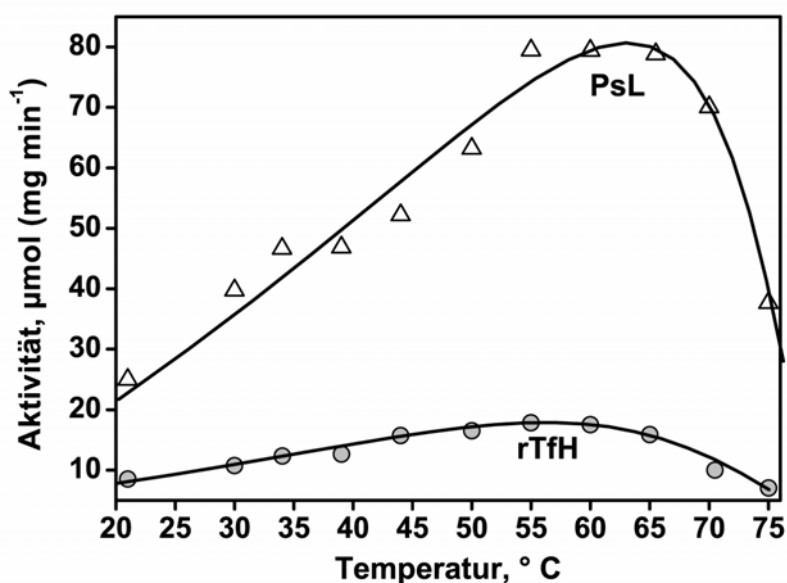


Abb. 5-13: Einfluss der Temperatur auf die PsL und rTfH Aktivität. Die Temperaturoptima wurden mit emulgiertem Triolein bestimmt. Die Aktivitäten wurden mittels der pH-stat Titration erfasst. Die Proteinkonzentration betrug bezüglich der Bestimmung mit Triolein für PsL $1,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ und für rTfH $3,3 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Die gemessenen T_{opt} von PsL und rTfH mit Triolein stehen im Widerspruch zu den T_{opt} die von Marten et al. [2003] bestimmt wurden (Tab. 5-6). Die Autoren untersuchten das Temperaturverhalten von PsL und wTfH (aus der Präparation von Kleeberg et al. [2005]) in Gegenwart des Substrates Adipinsäuredibutylester. Adipinsäuredibutylester entsteht beim Abbau von Polyestern wie zum Beispiel SP 4/6. Die spezifische Aktivität beider Hydrolasen am T_{opt} war überraschenderweise annähernd in der gleichen Größenordnung. T_{opt} der wTfH war mit 60 °C etwas höher als im Vergleich zur rTfH. Bei der PsL hingegen wurde maximale

Aktivität bei 50 °C gemessen. Damit lag T_{opt} deutlich unterhalb dem T_{opt} von 60-65 °C, welches mit Triolein bestimmt wurde.

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Temperaturoptima unterstreichen, dass die Reaktionsbedingungen und die Wahl des Substrates bei vergleichenden Enzymcharakterisierungen eine wichtige Rolle spielen. Hinsichtlich der Messungen in dieser Arbeit und der von Marten et al. [2003] wird dies besonders verdeutlicht, da in den Untersuchungen entgegengesetzte Rückschlüsse bezüglich des Temperaturoptimums gezogen werden. Daher sollten die erzielten Ergebnisse nur in Zusammenhang mit den verwendeten Substraten betrachtet werden.

Tab. 5-6: Temperatur- und Aktivitätsmaxima von der Wildstamm TfH (wTfH), der rekombinant produzierten TfH (rTfH) und der PsL in Gegenwart von Triolein und Adipinsäuredibutylester.

			Substrat	
			Triolein (emulgiert)	Adipinsäuredibutylester (emulgiert) ^b
Enzym	rTfH	Temperaturoptimum T_{opt} , °C	55	—
		spezifische Aktivität, $\mu\text{mol (mg min)}^{-1}$	18	—
	wTfH ^a	Temperaturoptimum T_{opt} , °C	—	60
		spezifische Aktivität, $\mu\text{mol (mg min)}^{-1}$	—	214
	PsL	Temperaturoptimum T_{opt} , °C	60-65	50
		spezifische Aktivität, $\mu\text{mol (mg min)}^{-1}$	80	280

^aDie Präparation der wTfH-Enzymformulierung ist in Kleeberg et al. [2005] beschrieben.

^bDaten wurden aus Marten et al. [2003] entnommen.

In der technischen Anwendung spielt neben dem Temperaturoptimum die Temperaturstabilität eine wichtige Rolle, da diese im Endeffekt über die Anwendungsdauer entscheidet. In Abb. 5-14 ist deshalb die Temperaturstabilität von PsL und rTfH bei 30 °C und 55 °C in einer 0,9 %ige NaCl-Lösung dargestellt. Der Abb. 5-14 ist zu entnehmen, dass die Aktivität der rTfH mit zunehmender Inkubationsdauer bei beiden Temperaturen deutlich langsamer abfiel als es für die PsL der Fall war. Bei beiden Hydrolasen war die Temperaturstabilität bei 55 °C signifikant geringer als bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C. Die geringere Temperaturstabilität der PsL steht zunächst im Widerspruch zu dessen

hohem Temperaturoptimum (Tab. 5-6). Dieser hebt sich jedoch auf, wenn die Testdauer, die zur Bestimmung des T_{opt} mit Triolein verwendet wurde und 20 min betrug, betrachtet wird. Einen Einfluss auf das Temperaturverhalten könnte der Reinheitsgrad der Enzymformulierung haben. Die PsL-Formulierung verfügt über einen Proteingehalt von 50 %, von dem wiederum nur 50 % der PsL zuordnet werden können (Kap. 4.8.1 und Kap. 5.2.2). So zeigen beispielsweise Messungen von Gouda et al. [2002], dass die Temperaturstabilität einer aufgereinigten TfH deutlich höher ist als bei der entsprechenden Rohfraktion des Enzyms.

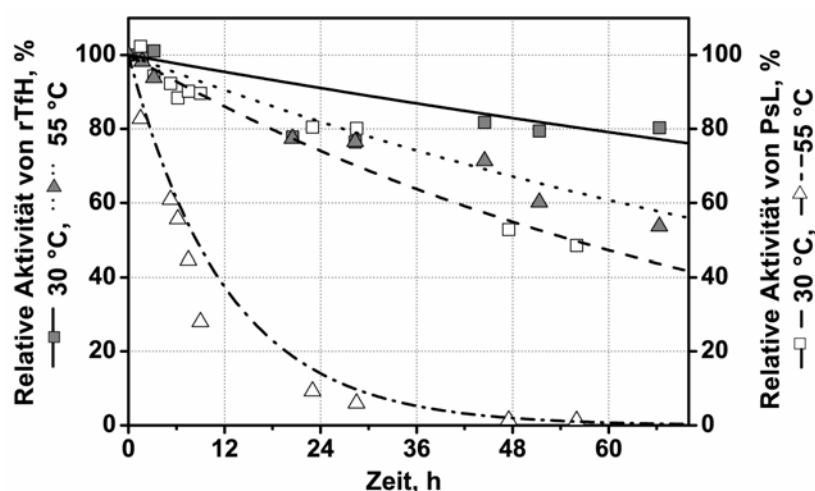


Abb. 5-14: Relative Temperaturstabilität von rTfH und PsL bei einer Aufbewahrungstemperatur von 30 °C und 55 °C in 0,9 % NaCl. Bis zur Bestimmung der Restaktivität wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt und anschließend mit Hilfe des *p*-NPP-Enzymtests vermessen.

Tab. 5-7: Halbwertszeiten der wTfH, rTfH und PsL bei unterschiedlichen Temperaturen.

Enzym	Medium	Enzymkonzentration, mg mL ⁻¹	Temperatur, °C	Halbwertszeit, $t_{1/2}$, h
rTfH	0,9 % NaCl	1,4	30	178
			55	84
wTfH, [Gouda et al. 2002]	Kulturüberstand	n.b.	30	58
			60	3
PsL	0,9 % NaCl	1,4	30	56
			55	9

Parallel zur graphischen Darstellung des Temperaturverhaltens der Enzyme sind in Tab. 5-7 die Halbwertszeiten dargestellt. Ein Vergleich der Halbwertszeiten der kaum aufgearbeiteten Wildstamm-TfH Präparation mit der hoch aufgereinigten rTfH verdeutlicht den Einfluss des Reinheitsgrades auf die Enzymstabilität. Besonders bei höheren Temperaturen wirkt sich dies positiv auf die rTfH Stabilität aus.

5.2.2.2 pH-Optimum

Analog zum vorangegangenen Abschnitt sind für die technische Anwendung auch Enzyme mit einem breiten pH-Optimum von Vorteil. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert wird allgemein durch die funktionellen Seitenketten der Aminosäuren im katalytischen Zentrum beeinflusst. Hinzu kommen Konformationsänderungen im Proteingerüst oder beispielsweise elektrostatische Wechselwirkungen, die zur Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit beitragen können [Bisswanger 1979].

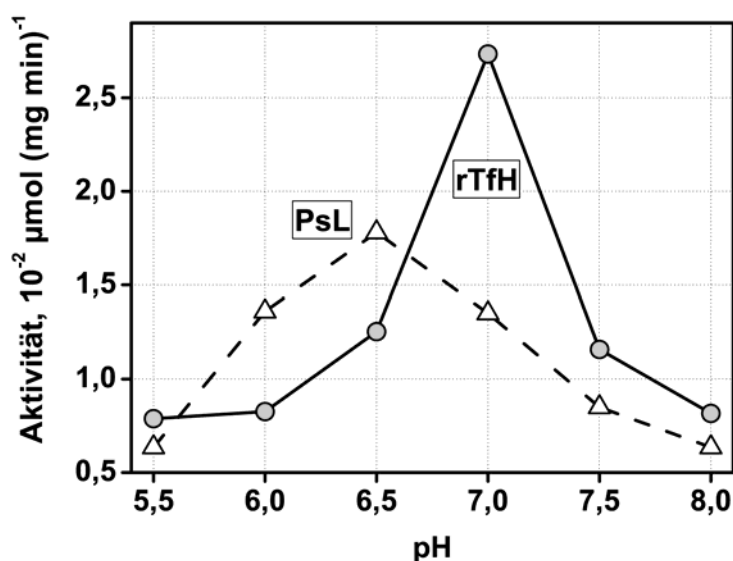


Abb. 5-15: rTfH und PsL Aktivitäten (Proteinkonzentration: $8,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) gegenüber BTA 40/60 Filmen in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 55°C . Die Enzymaktivität wurde photometrisch in einem Zeitraum von 2 h über die Absorptionzunahme ($\lambda=242 \text{ nm}$) der löslichen Spaltprodukte in Gegenwart von 50 mM Phosphatpuffer bestimmt.

Die pH-Optima der Hydrolasen PsL und rTfH wurden mit einem Enzymtest von Kleeberg et al. [2005] photometrisch über die Zunahme wasserlöslicher aromatischer Polyesterspaltprodukte, welche bei der enzymatischen Hydrolyse des aliphatisch-

aromatischen Copolyester BTA 40/60 entstehen, erfasst. Die Messungen wurden bei 55 °C in 50 mM Phosphatpuffer durchgeführt. In Abb. 5-15 ist die Hydrolyserate der Estergruppen an der Oberfläche des BTA 40/60 Films mit PsL und rTfH in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Beide Hydrolasen zeigten im neutralen pH-Bereich hohe Aktivitäten. Sowohl im sauren als auch im alkalischen pH-Bereich war kaum eine enzymatische Hydrolyse von Estergruppen zu messen. Das pH-Optimum der PsL war mit einem pH-Wert von 6,5 um 0,5 niedriger als das der rTfH. Besonders rTfH zeigte nur über einen engen pH-Bereich hohe Aktivitäten. Hier nahm die Aktivität vom pH-Optimum (7,0) zu pH 6,5 bzw. 7,5 um mehr als die Hälfte ab.

Ein Vergleich der pH-Optima, welche für wTfH photometrisch über die Hydrolyse von BTA 40/60 Filmen [Kleeberg et al. 2005] und für PsL am pH-Stat Titrator über die Hydrolyse von Adipinsäuredibutylester [Marten 2000] erfasst wurden, zeigt wie bei den Untersuchungen zur Bestimmung der Temperaturoptima auf, dass variierende Reaktionsbedingungen auch hier zu unterschiedlichen Ergebnissen und damit auch zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen führen können. Für die wTfH wurde bei einer Phosphatpufferkonzentration von 20 mM und 100 mM ein pH-Optimum pH 6,5 bestimmt und liegt damit etwas unterhalb dem pH-Optimum der rTfH [Kleeberg et al. 2005]. Für PsL wurden mit dem Substrat Adipinsäuredibutylester sogar zwei Aktivitätsmaxima bei pH 8 und pH 10 ermittelt, wobei letzteres auf eine mögliche rein chemische Hydrolyse zurückgeführt wurde [Marten 2000].

5.2.2.3 Grenzflächenaktivierung und Substratspektrum

In den folgenden Experimenten wurde das Substratspektrum der rTfH und der Lipase PsL in Bezug auf ihre Aktivität sowohl gegenüber wasserunlöslichen und wasserlöslichen niedermolekularen Estersubstraten untersucht. Im Vorfeld der Substratspektrumsbestimmung wurde die Grenzflächenaktivierung beider Hydrolasen betrachtet. Enzyme sind grenzflächenaktiviert, wenn beim Überschreiten der kritischen Mizellenkonzentration (CMC) eines lipophilen Substrates eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität auftritt (Kap. 3.2). Bei grenzflächenaktivierten Enzymen wird dieses Verhalten einer deckelähnlichen Oberflächenstruktur, der „Deckel“-Domäne, zugeordnet [Brzozowski et al. 1991]. Diese amphiphile Deckelstruktur, welche dem umgebenen Medium zugewandten Seite vorwiegend hydrophil ist, bedeckt das aktive Zentrum und verhindert die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes. Erst nach Kontakt mit der hydrophoben Matrix klappt der Deckel durch eine Konformationsänderung des Enzymgerüsts auf und das Substrat kann in das aktive Zentrum

eindringen. Durch diese Konformationsänderung wird die hydrophobe Innenseite des Deckels dem Substrat zugewandt und vergrößert dabei die hydrophobe Proteinoberfläche um das aktive Zentrum herum. Ziel der Untersuchungen war es mit Hilfe der erfassten Daten, Rückschlüsse auf den enzymatischen Mechanismus an der hydrophoben Polyesteroberfläche zu ziehen. Des Weiteren sollte die rTfH näher klassifiziert werden, um eine Einordnung des Enzyms in die Gruppe der Lipasen, Cutinasen oder Esterasen zu ermöglichen.

Grenzflächenaktivierung

Die Grenzflächenaktivierung beider Enzyme wurde mit dem Triglycerid Triacetin durchgeführt (Abb. 5-16). Im Gegensatz zu langkettigen Triglyceriden liegt Triacetin als Monomer bis zu einer Konzentration von 223 mM (CMC) in Wasser gelöst vor und ist somit zur Bestimmung von Enzymaktivitäten im gelöstem und im später emulgierten Zustand geeignet. Nach Überschreiten der kritischen Mizellenkonzentration bleibt die Konzentration an Triacetin-Monomeren im Wasser konstant und eine weitere Zugabe von Triacetin führt nur zu einer weiteren Erhöhung der Mizellenkonzentration.

Sowohl PsL als auch rTfH zeigten Aktivität gegenüber wasserlöslichem Triacetin, wobei die rTfH-Aktivität deutlich höher war (Abb. 5-16). Beim Überschreiten der kritischen Mizellenkonzentration erhöhte sich die spezifische Aktivität der PsL sprunghaft um einen Faktor von 5 und zeigt somit eindeutig, dass es sich bei PsL um ein grenzflächenaktiviertes Enzym handelt. rTfH hingegen zeigte dieses Verhalten nicht, sondern folgte dem Verhalten einer typischen Esterase mit einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik. Nach Überschreiten der CMC war keine weitere Erhöhung der Enzymaktivität zu beobachten und die spezifische Enzymaktivität blieb konstant bei einem Wert von etwa $850 \mu\text{mol (mg min)}^{-1}$. Oberhalb der CMC deutet der ermittelte Kurvenverlauf darauf hin, dass rTfH Triacetinmoleküle, welche in einer Mizelle aggregiert sind, nicht hydrolysiert und nur in Wasser gelöste Triacetin-Monomere angreift. Im Falle einer Erhöhung der Enzymkonzentration müsste sich demnach unter der Annahme einer konstanten Konzentration an gelösten Triacetin-Monomeren die spezifische Aktivität der rTfH verkleinern. Jedoch führte eine Verdopplung der Enzymkonzentration zu keiner Veränderung der spezifischen Aktivität (Daten nicht gezeigt) und eine Hydrolyse von nur wasserlöslichen Triacetin-Monomeren kann weitestgehend ausgeschlossen werden.

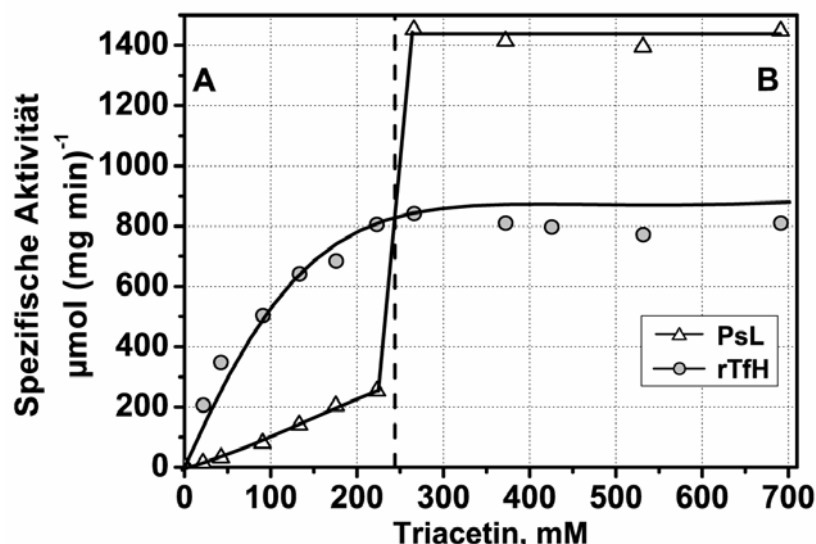


Abb. 5-16: Enzymaktivität gegenüber gelöstem (A) und emulgiertem (B) Triacetin bei einer Temperatur von 40 °C. Enzymkonzentration von PsL und rTfH betrugen $1,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Der Übergang in von gelöster zu emulgierter Phase ist durch die gestrichelte Linie dargestellt.

Die Untersuchungen zur Grenzflächenaktivierung der rTfH und der PsL können einen möglichen Aufschluss über strukturelle Merkmale der Hydrolasen geben. Eine vorhandene Grenzflächenaktivierung der Enzyme würde auf das Vorhandensein der sogenannten „Deckel“-Domäne hindeuten [Brzozowski et al. 1991]. So wurde bisher noch keine Lipase identifiziert, die keine „Deckel“-Struktur besitzt und grenzflächenaktiviert ist [van Pouderooyen et al. 2001, Jaeger et al. 1994].

Die für die Lipase PsL nachgewiesene Grenzflächenaktivierung gegenüber dem Triglycerid Triacetin weist darauf hin, dass eine „Deckel“-Domäne das aktive Zentrum der PsL bedeckt und somit für wasserlösliche Ester nicht zugänglich sein sollte. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass die „Deckel“-Domäne bei der Lipase PsL wohl kein starres Strukturelement ist, welches erst nach Adsorption an die hydrophobe Matrix das aktive Zentrum freigibt. Dieser Befund wird durch Röntgenstrukturanalysen der Lipase aus *Humicola lanuginosa* gestützt [Derewenda et al. 1994]. Die Autoren zeigten, dass die Deckeldomäne nicht starr ist und auch im wässrigen Milieu Konformationsänderungen vornimmt. Als Folge dessen könnten so auch wasserlösliche Substrate in das aktive Zentrum diffundieren.

Für rTfH wurde in Bezug auf das Substrat Triacetin keine Grenzflächenaktivierung beobachtet, was zunächst erstmal für das Fehlen einer „Deckel“-Domäne spricht. Andererseits zeigen Kristallstrukturen bakterieller Lipasen, wie beispielsweise bei den Lipasen aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas glumae*, dass keine Grenzflächenaktivierung bei den Lipasen beobachtet wurde, obwohl eine „Deckel“-Domäne vorhanden ist [Noble et al. 1993, Nardini et al. 2000, Jaeger et al. 1993].

Abbau von wasserunlöslichen niedermolekularen Estersubstraten

Das Substratspektrum bezogen auf wasserunlösliche niedermolekulare Estersubstrate wurde in Triglyceridemulsionen verschiedener Kettenlänge bestimmt. Die Aktivitätsbestimmungen wurden unter enzymkontrollierten Bedingungen (Enzymunterschuss) durchgeführt. Aus Abb. 5-17 geht hervor, dass prinzipiell beide Hydrolasen alle verwendeten Triglyceride hydrolysierten, wobei PsL meistens höhere Aktivitäten aufwies. Besonders in Gegenwart von Tricaprylin (C=8) wies PsL mit einer spezifischen Enzymaktivität von $2940 \mu\text{mol (mg min)}^{-1}$ eine vierfach höhere Aktivität auf als rTfH.

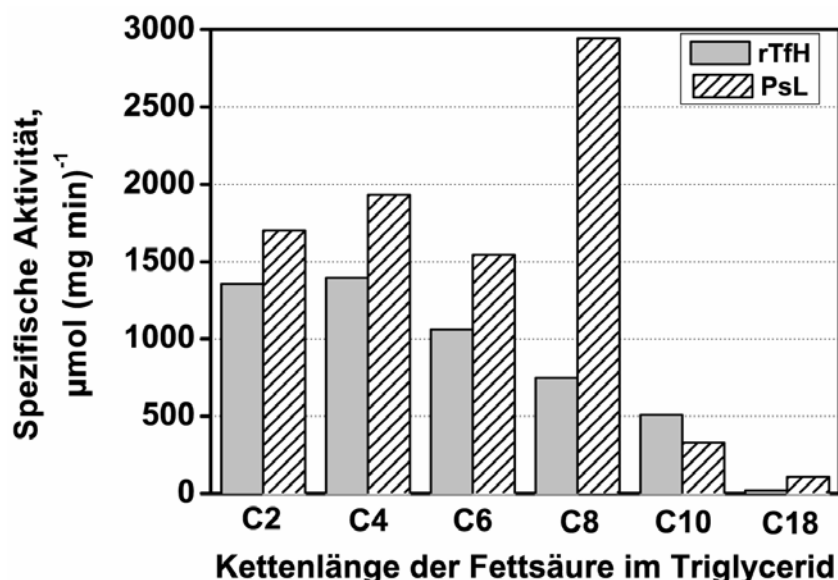


Abb. 5-17: rTfH ($3,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) und PsL ($1,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) Aktivität in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Fettsäure im Triglycerid bei 55°C .

Eine Analyse des Triglyceridspektrums für die jeweilige Hydrolase zeigte für rTfH höhere Enzymaktivitäten gegenüber kurzkettigen Triglyceriden, wobei die Enzymaktivität gegenüber Tributyrin (Kettenlänge von vier Kohlenstoffatomen) am höchsten war. PsL wies analog zu

rTfH gegenüber kurzkettigen Triglyceriden höhere Enzymaktivitäten als gegenüber langkettigen auf. Höchste Enzymaktivität wurde hier gegenüber Tricaprylin (C=8) gemessen. Zusammenfassend lässt dies den Schluss zu, dass sowohl PsL als auch rTfH relativ unspezifisch gegenüber den untersuchten Triglyceriden sind, wobei eine Präferenz für Triglyceride mit kurzer bis mittlerer Kettenlänge zu beobachten ist.

Hydrolyse von wasserlöslichen aromatischen Esterverbindungen

Für PsL und für rTfH wurde die Esteraseaktivität gegenüber wasserlöslichem Triacetin nachgewiesen (Abb. 5-16). Die Strukturbausteine von Triacetin, Glycerin und Essigsäure, sind aliphatisch. Im Folgenden sollte geklärt werden, inwiefern aromatische Strukturelemente die Hydrolyse wasserlöslicher Estergruppen beeinflussen. Daher wurde die Esteraseaktivität gegenüber den Substraten, 4-Hydroxybutylterephthalsäuremonoester (BT) und Di-4-Hydroxybutylterephthalsäurediester (BTB) gemessen. Beide Substrate sind Produkte des Abbaus aromatischer Polyester.

Die Ester BT und BTB (Tab. 5-8) wurden sowohl von rTfH als auch von PsL im Vergleich zu Triacetin deutlich langsamer hydrolysiert. Dies deutet darauf hin, dass offenbar sterische Effekte bei dem nukleophilen Angriff der Esterbindung eine Rolle spielen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Marten [2000] gemacht, die die Hydrolyse von niedermolekularen Modelleestern mit aliphatischen und aromatischen Strukturelementen näher untersuchte. Die Autorin führte die Ergebnisse auf die räumlichen Verhältnisse im aktiven Zentrum zurück, die die erforderliche Ausrichtung des Substrates mit aromatischen Strukturelementen unter Umständen nicht optimal zulässt.

Tab. 5-8: Die spezifischen Enzymaktivitäten der rTfH und der PsL gegenüber wasserlöslichen aromatischen Estersubstraten.

Substrat	Reaktionstemperatur, °C	spezifische Enzymaktivität, μmol (mg min) ⁻¹	
		rTfH	PsL
BT ¹	30	5,9	0,036
BTB ²	30	4,6	0,022

¹4-Hydroxybutylterephthalsäuremonoester; ²Di-4-Hydroxybutylterephthalsäurediester

Vergleicht man die Hydrolyseraten beider Enzyme gegenüber aromatischen Estern miteinander, werden ebenfalls signifikante Unterschiede sichtbar. rTfH zeigte gegenüber BT (BTB) 160fach (210) höhere Abbauraten als PsL. Die signifikant geringe Aktivität für PsL gegenüber den aromatischen Estern lässt sich möglicherweise auf die Ergebnisse zur Grenzflächenaktivierung zurückführen. Für die PsL wird vermutet, dass wahrscheinlich eine „Deckel“-Domäne das aktive Zentrum verdeckt. Die Untersuchungen haben aber auch ergeben, dass die „Deckel“-Domäne im wässrigen Milieu nicht starr zu sein scheint und so auch gelöstes Triacetin ins aktive Zentrum diffundieren kann und hydrolysiert wird. Es ist jedoch möglich, dass gegebenenfalls die „Deckel“-Domäne im wässrigen Milieu nicht vollständig aufklappt und somit der Zugang zum aktiven Zentrum eingeschränkt ist. Hinsichtlich der starren aromatischen Strukturbausteine im Estersubstrat kann dies bedeuten, dass so durch die „Deckel“-Domäne die Diffusion ins aktive Zentrum gegebenenfalls vermindert ist und letztendlich zu geringen Hydrolyseraten führt.

5.2.2.4 Das dreidimensionale Proteinmodell der Hydrolase TfH

Die bisher untersuchten Eigenschaften der Hydrolase TfH können Hinweise auf den molekularen Aufbau der Proteinstruktur geben. Die fehlende Grenzflächenaktivierung der rekombinant produzierten rTfH weist auf ein mögliches Fehlen einer Deckelstruktur hin. Die hohe Aktivität gegenüber löslichen Estersubstraten unterstützt diese Vermutung.

Die experimentelle Bestimmung dreidimensionaler Proteinstrukturen mit Hilfe der Röntgenkristallographie oder der Kernmagnetischen Resonanzspektroskopie sind sehr zeitaufwendig. Daher wurde zunächst eine Strukturvorhersage mit Hilfe computergestützter Modelle von der Hydrolase aus *T. fusca* erstellt, welche auf der Grundlage einer bereits bekannten dreidimensionalen Struktur eines homologen Proteins beruht (*Homology Modelling*). Unter der Annahme, dass eine ähnliche Proteinstruktur vorliegt, kann dann die bekannte Struktur als Vorlage benutzt werden, um das dreidimensionale Proteinmodell zu erstellen.

Das dreidimensionale Proteinmodell der TfH wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Joachim Reichelt und Herrn Dr. Joop van den Heuvel im Bereich der Strukturbiologie des Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung erstellt. Hinsichtlich der TfH-Strukturvorhersage wurde auf die bekannte Röntgenstruktur der *Streptomyces exfoliatus* Lipase (PDB code: 1JFR) zurückgegriffen [Wei et al. 1998]. In einem ersten Schritt wurde ein Alignment der Aminosäuresequenzen der TfH und der *Streptomyces exfoliatus* Lipase (SeL) erstellt (Abb.

5-18), welche eine Sequenzähnlichkeit von 62 % aufwiesen. Basierend auf diesem Alignment wurde eine erste automatische Strukturvorhersage erstellt. Anschließend wurden Seitenketten und Loops innerhalb des Tfh-Proteinmodells manuell angepasst und das endgültige dreidimensionale Proteinmodell abschließend durch Energieminimierung komplementiert (Kap. 4.9).

	1	10	20	30	40
TfH	AANPYERGP	NPTDALLEAS	SGPFSVSEEN	VSRLSASGFG	GGTIYYPR--ENN
SeL	--NPYERGP	APTNASIEAS	RGPYATSQTS	VSSLVASGFG	GGTIYYPTSTADG
	51	60	70	80	90
TfH	TYGAVAIISP	GYTGTEASIA	WLGERIASHG	FVVITIDTIT	TLDQPDSRAEQ
SeL	TFGAVVISIP	GFTAYQSSIA	WLGPRLASQG	FVVFTIDTNT	TLDQPDSRGRQ
	100	110	120	130	140
TfH	LNAALNHMI	NRASSTVRSR	IDSSRLAVMG	HSMGGGGTLR	LASQRPDLKAA
SeL	LLSALDYLT	QRSS--VRTR	VDATRLGVMG	HSMGGGGSLE	AAKSRTSLKAA
	150	160	170	180	190
TfH	IPLTPWHLN	KNWSSVTVP	LIIGADLDTI	APVATHAKPF	YNSLPSSISKA
SeL	IPLTGWNTD	KTWPELRTPT	LVVGADGDTV	APVATHSKPF	YESLPGLDKA
	200	210	220	230	240
TfH	YLELDGATH	FAPNIPNKII	GKYSVAWLKR	FVDNDTRYTQ	FLCPGPRDGLF
SeL	YLELRGASH	FTPNTSDTTI	AKYSISWLKR	FIDSDTRYEQ	FLCPIPRPSLT
	250	260			
TfH	GEVEEYRST	CPF--			
SeL	--IAEYRGT	CPHTS			

Abb. 5-18 Sequenzalignment der Aminosäuresequenzen der Hydrolase Tfh und der *Streptomyces exfoliatus* Lipase (SeL). Das „Multiple Alignment“ wurde mit ClustalW erstellt [Thompson et al. 1994]. Voneinander abweichende Aminosäuren sind grau unterlegt.

Die Hydrolase aus *Thermobifida fusca* weist das für alle Serin-Hydrolasen typische α/β -Hydrolasen-Faltungsmuster (Abb. 3-1) auf. Das topologische Modell der Tfh (Abb. 5-19) zeigt zusätzlich zum typischen α/β -Hydrolasen-Faltungsmuster einen antiparallelen β -Strang β_9 am C-Terminus, die α -Helix α_D fehlt, und α_A , α_B , α_F sind mehrere kleine Helices untergliedert. Zudem befindet sich am N-Terminus und hinter dem ersten β -Strang β_1 eine weitere α -Helix. Der zusätzliche β -Strang β_9 am C-Terminus ist auch bei der SeL zu finden [Nardini und Dijkstra 1999, Wei et al. 1998]. Ser131, His209 und Asp175 bilden die katalytische Triade.

Abb. 5-20 zeigt die Oberflächenstruktur der TfH. Das katalytische Zentrum ist in einer hydrophoben Furche eingebettet und nicht von einer "Deckel"-Domäne abgedeckt (Abb. 5-20B). Demnach stützt das Proteinmodell die experimentellen Daten und erklärt die hohen Aktivitäten gegenüber wasserlöslichen Estersubstraten sowie die fehlende Grenzflächenaktivierung. Auffällig sind zudem die stark hydrophoben Bereiche um das katalytische Zentrum herum, aus denen sich möglicherweise die hohe Affinität für hydrophobe Substrate erklären ließe (Abb. 5-20A). Das katalytische Zentrum des TfH-Proteinmodells weist einen hohen Anteil an aromatischen Aminosäuren auf.

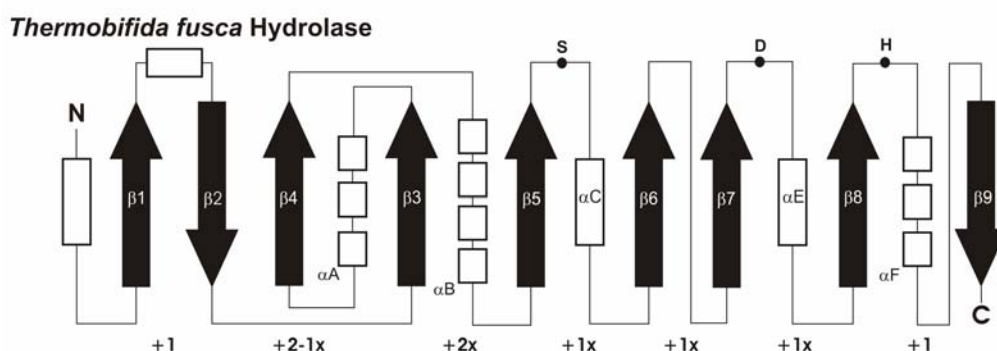


Abb. 5-19: Topologisches Modell der α/β -Hydrolasenfaltungsmuster der *Thermobifida fusca* Hydrolase.

Die Beschriftung der α -Helices (weiße Quadrate) sowie die Nummerierung der β -Faltblätter (schwarze Pfeile) ist am α/β -Hydrolasenfaltungsmuster nach Ollis et al. [1992] angelehnt. Die Verknüpfung der β -Stränge ist nach der Nomenklatur von Richardson [1981] beschrieben. Die Position der Aminosäuren der katalytischen Triade sind mit schwarzen Kreisen markiert.

Ein weiteres strukturelles Merkmal von α/β Hydrolasen ist das Oxyanionenloch, das zur Stabilisierung des tetraedrischen Zwischenproduktes dient und essentiell für die katalytische Aktivität von Lipasen ist. Bei Lipasen wird das Oxyanionenloch meist erst nach Kontakt mit einer hydrophoben Oberfläche, welche eine Konformationsänderung der Lipase bewirkt, ausgebildet [Brzozowski et al. 1991]. Ausnahmen bilden hier die Lipase aus *Bacillus subtilis* und die SeL, bei denen Röntgenstrukturen gemessen wurden, in denen das Oxyanionenloch offenbar bereits vor dem Kontakt mit dem Substrat in der richtigen Ausrichtung zum aktiven Zentrum steht [van Pouderoyen et al. 2001, Wei et al. 1998]. Vergleichbares wurde auch für die Cutinase aus *Fusarium solani* f. *pisi* beschrieben [Martinez et al. 1994]. Dadurch ist auch eine Hydrolyse von wasserlöslichen Estern prinzipiell möglich. Das vorliegende TfH-Strukturmodell lässt jedoch keine Aussage darüber zu, ob das Oxyanionenloch der TfH

bereits in der richtigen Konformation zur katalytischen Triade steht. Die gemessenen hohen spezifischen Aktivitäten der rTfH gegenüber löslichen Estersubstraten weisen jedoch auf ein korrekt ausgerichtetes Oxyanionenloch hin.

Kurz vor Abschluß dieser Arbeit gelang in dem Bereich Strukturbiologie des HZI die Kristallisation der TfH und eine Röntgenstrukturanalyse konnte durchgeführt werden. Eine erste aus den Messungen abgeleitete Struktur bestätigt das hier erstellte Proteinmodell weitestgehend.

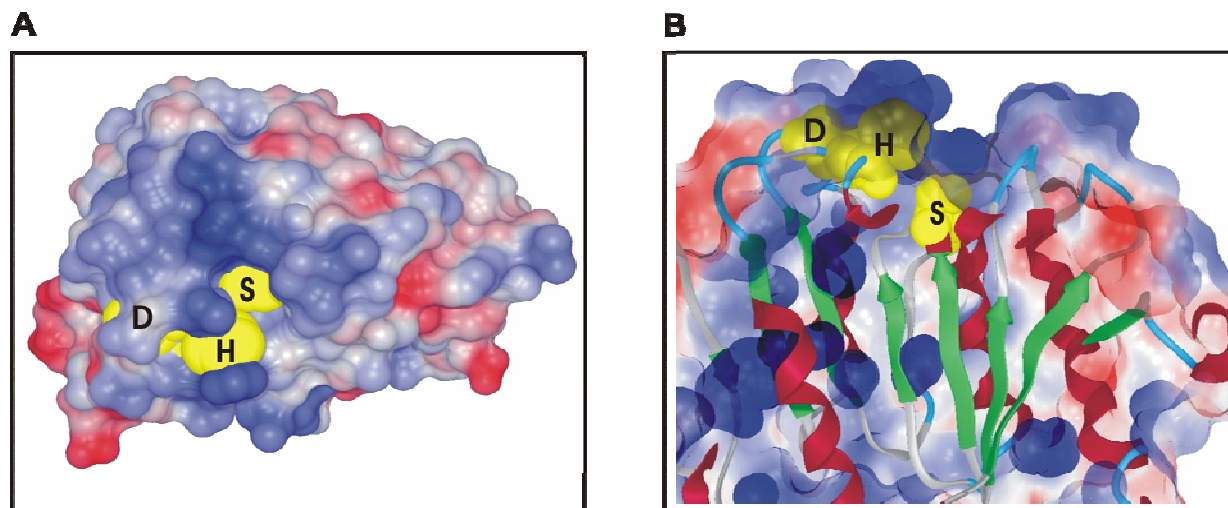


Abb. 5-20 (A) Die Oberflächenstruktur und die katalytische Triade des dreidimensionalen Proteinmodells der Hydrolase aus *Thermobifida fusca*. Hydrophobe und hydrophile Aminosäuren sind blau bzw. rot gefärbt. Die Aminosäuren der katalytischen Triade Ser131, Asp175 und His209 sind durch gelbe Sphären hervorgehoben, wobei zur besseren Darstellung der Sphärenradius um das anderthalbfache vergrößert ist. (B) Schnitt durch das dreidimensionale Proteinmodell der TfH und die Darstellung des α/β -Hydrolasenfaltungsmusters (α -Helices: rot; β -Faltblätter: grün) sowie der katalytischen Triade (gelbe Sphären). Das Modell wurde um 90 ° gedreht, um das furchenähnliche katalytische Zentrum besser sichtbar zu machen.

5.2.3 Enzymatische Hydrolyse von Polyesterfilmen

Im Folgenden soll die katalytische Aktivität der rTfH und PsL zur Spaltung nicht wasserlöslicher, hochmolekularer Ester untersucht werden. Bei Untersuchungen zum heterogenen enzymatischen Abbau an Polyesteroberflächen muss grundsätzlich zwischen enzymkontrollierten und oberflächenkontrollierten Bedingungen unterschieden werden. Im Falle des enzymkontrollierten Abbaus ist die Polyesteroberfläche nicht vollständig mit Enzym gesättigt und ist daher abhängig von der zugesetzten Enzymmenge. Aus Messungen im Enzymunterschied lassen sich daher vorwiegend enzymespezifische Informationen wie Adsorptionsverhalten oder Verhalten gegenüber dem pH-Wert bzw. gegenüber der Temperatur gewinnen. Der Abbau unter oberflächenkontrollierten Bedingungen ist von der eingesetzten Enzymkonzentration unabhängig, da die verfügbare Oberfläche vollständig mit Enzym belegt

ist, und stellt somit eine Reaktion nullter Ordnung dar. Unter enzymgesättigten Bedingungen können Aussagen über substratspezifische Einflüsse auf den enzymatischen Polyesterabbau wie etwa Polyesterzusammensetzung und Polyesterschmelztemperatur gewonnen werden.

Aus Abb. 5-21 ist der Abbau eines SP 4/6 Films unter enzym- und oberflächenkontrollierten Bedingungen mit rTfH und PsL gezeigt. Bei niedrigen Enzymkonzentrationen war eine Reaktion erster Ordnung in Bezug auf die zugesetzte Enzymmenge zu beobachten, die nach einer Übergangsphase in eine Reaktion nullter Ordnung überging. Ab einer Enzymkonzentration von etwa $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ war die Abbaugeschwindigkeit dann unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration und wurde somit ausschließlich von der verfügbaren Polyesteroberfläche kontrolliert.

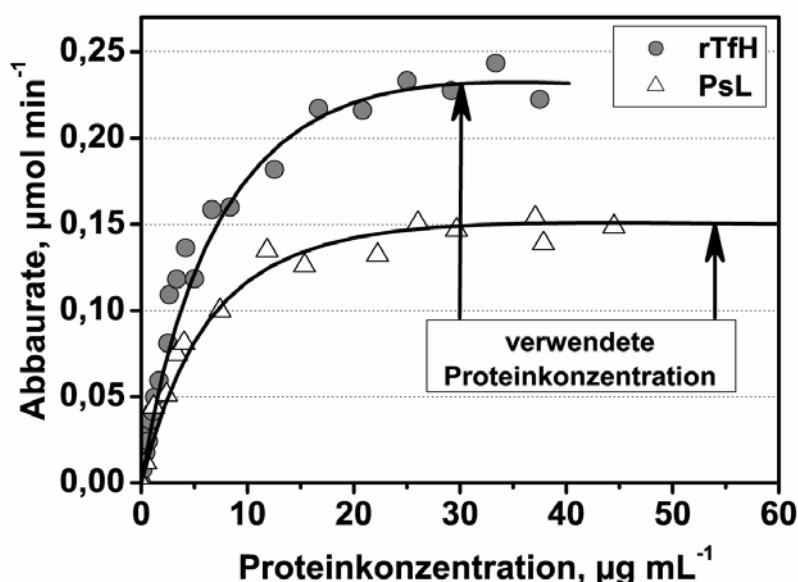


Abb. 5-21: Abbau eines SP 4/6 Films (\varnothing 12 mm) in Abhängigkeit von der rTfH und PsL Proteinkonzentration (30 °C, 0,9 % NaCl-Lösung). Die aufgetragene Enzymkonzentration ergibt sich aus der zudosierten Enzymmenge und dem Testvolumen von 6 mL. Die Pfeile markieren die rTfH und PsL Enzymkonzentrationen, die für die Messungen mit Filmen im Enzymüberschuss eingesetzt wurden.

In den folgenden Experimenten sollte der Abbau verschiedener Polyester mit PsL und rTfH untersucht und verglichen werden. Alle Messungen wurden hierbei unter oberflächenkontrollierten Bedingungen im Enzymüberschuss durchgeführt, wobei rTfH- und PsL-Proteinkonzentrationen von $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. $54 \mu\text{g mL}^{-1}$ verwendet wurden. Die PsL-Proteinkonzentration von $54 \mu\text{g mL}^{-1}$ wurde dabei so hoch gewählt, um einen direkten Vergleich mit früheren Veröffentlichungen zu ermöglichen [Marten et al. 2003, 2005].

5.2.3.1 Vergleich der Polyesterabbauraten

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der enzymatische Abbau von aliphatischen Polyestern und aliphatisch-aromatischen Copolyestern durch PsL mit der Differenz des Schmelzpunktes und der Abbautemperatur (ΔT_{mt}) korreliert [Marten et al. 2003, 2005]. Eine signifikante Erhöhung der Abbaugeschwindigkeit wurde beobachtet, wenn die Temperaturdifferenz ΔT_{mt} (Differenz zwischen Polyesterschmelzpunkt und Messtemperatur) unter 30 °C sank (Kap. 3.7.2.3). Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass signifikante Unterschiede im Hydrolyseverhalten von Polyestern mit der Hydrolase aus *Thermobifida fusca* im Vergleich zu anderen Lipasen vorliegen [Kleeberg et al. 2005, Kleeberg 1999]. So zeichnet sich die TfH im Gegensatz zu den klassischen Lipasen z.B. durch den vollständigen Abbau von Polyestern in deren Monomere aus. Vor diesem Hintergrund stellte sich nun die Frage, ob der Abbau der Polyester mit der rTfH den gleichen Abhängigkeiten in der Temperaturdifferenz ΔT_{mt} unterliegt wie bei der PsL. Zur Beantwortung dieser Frage wurden analog zu den Arbeiten von Marten et al. [2003, 2005] vergleichende Abbauuntersuchungen mit PsL und rTfH an verschiedenen Polyestern durchgeführt.

In Abb. 5-22 sind die Abbauraten verschiedener aliphatischer Polyester als auch aliphatisch-aromatischer Copolyester mit rTfH und PsL in Abhängigkeit von der Temperaturdifferenz ΔT_{mt} dargestellt. Identisch zu den Ergebnissen von Marten et al. [2003, 2005] zeigte der Polyesterabbau mit PsL eine deutliche Abhängigkeit von der Temperaturdifferenz ΔT_{mt} . Der Verlauf der Anfangsabbauraten mit rTfH erwies sich als vergleichbar. Unterhalb einer Temperaturdifferenz von 30 °C war ebenfalls eine signifikante Zunahme der Abbaugeschwindigkeiten messbar. Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass der hydrolytische Abbau von Polyestern mit rTfH und PsL wohl grundsätzlich den gleichen Mechanismen gehorcht.

Vergleicht man die Abbaugeschwindigkeiten für die einzelnen Polyester nun aber genauer, war für rTfH jeweils eine etwas höhere katalytische Aktivität als für PsL feststellbar. Besonders bei den aliphatisch-aromatischen Polyestern trat dieser Effekt zum Vorschein. Hier konnten für PsL und rTfH eindeutig unterschiedliche Kurvenverläufe identifiziert werden. Zudem war rTfH im Gegensatz zu PsL in der Lage den relativ hoch schmelzenden Polyester SP 4/4 und sogar den aromatischen Polyester Poly(butylenterephthalat) (PBT) anzugreifen.

Während PsL gegenüber den emulgierten Triglyceriden (Abb. 5-17) mit einem vergleichsweise niedrigen Molekulargewicht höhere Aktivitäten zeigt als rTfH, weist letzteres Enzym an den festen Oberflächen der langkettigen Polyester mit einem mittleren Molekulargewicht $\geq 20.00 \text{ g mol}^{-1}$ eine deutlich höhere Aktivität auf.

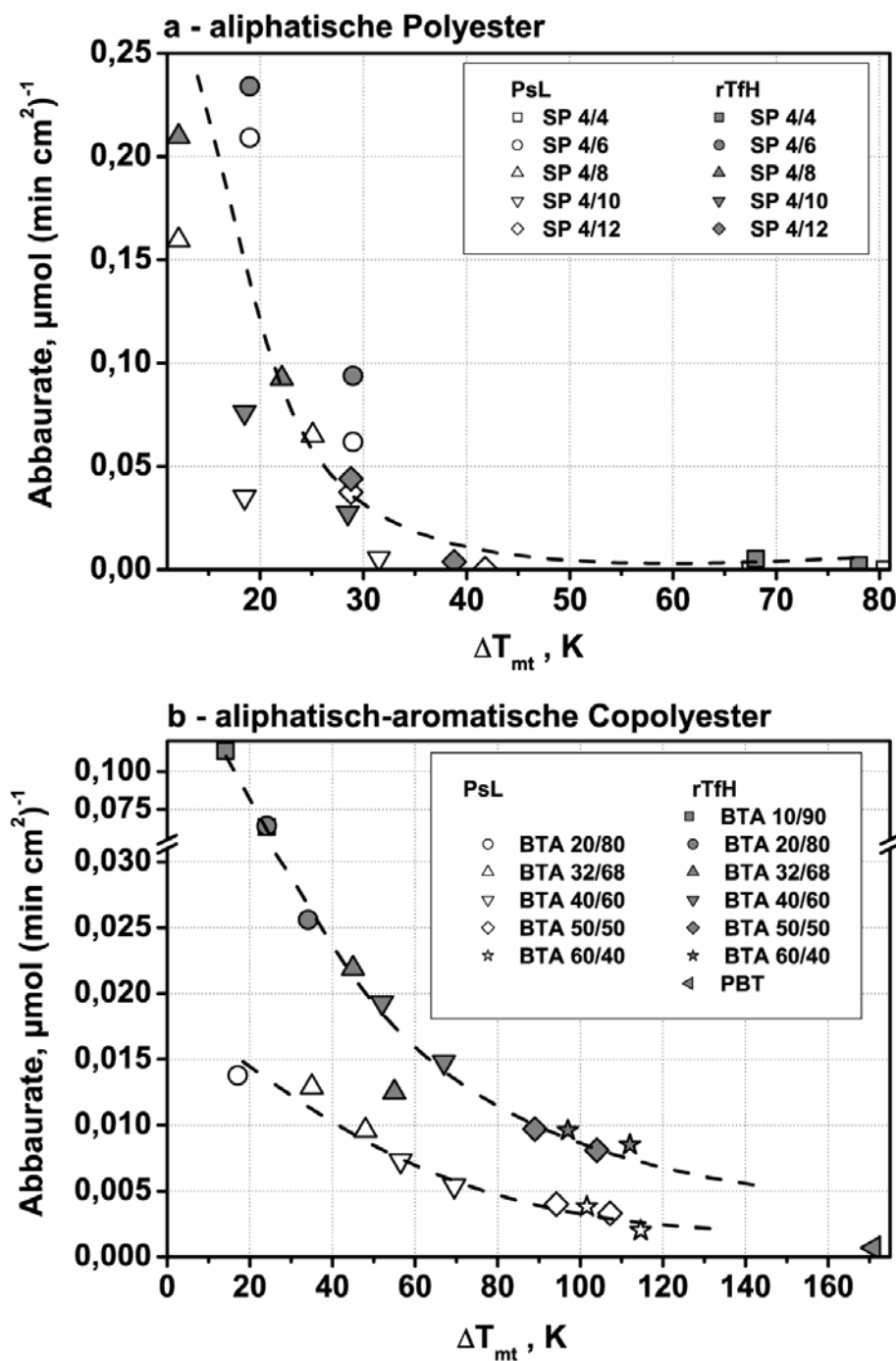


Abb. 5-22: Abbau von SP X/Y (a) und BTA X/Y (b) Filmen (1 Film, \varnothing 12 mm) in Abhängigkeit von der Differenz des Schmelzpunktes und der Abbautemperatur (ΔT_{mt}). Messungen wurden in 0,9 % NaCl-Lösung durchgeführt. Die Proteinkonzentration für rTfH und PsL betrug $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. $54 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Dieser beobachtete Unterschied in der Aktivität könnte unter Berücksichtigung des Mechanismus der heterogenen Katalyse unter Umständen auf ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten zwischen PsL und rTfH zurückgeführt werden. Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten beider Enzyme an Polyesterfilmen und -nanopartikeln erbrachten

allerdings keinen eindeutigen Hinweis, dass signifikante Unterschiede im Adsorptionsverhalten vorliegen [Sieblitz 2006]. Sowohl der maximale Belegungsgrad q_{\max} als auch die Langmuirsche Adsorptionsgleichgewichtskonstante K_A waren bei beiden Hydrolasen vergleichbar. Demnach sind die erzielten Ergebnisse wohl auf unterschiedliche räumliche Geometrien im katalytischen Zentrum der verwendeten Hydrolasen zurückführen. Möglicherweise können sich die Polyesterketten besser in das aktive Zentrum der rTfH als in das der PsL einpassen und so leichter hydrolysiert werden. Weiterhin könnte die sterische Kompatibilität des aktiven Zentrums mit der chemischen Umgebung der Estergruppen eine Rolle spielen, die eine korrekte Ausrichtung der zu spaltenden Estergruppe zur katalytischen Triade einschränkt. Die Aktivitätsmessungen mit den wasserlöslichen Estern BT und BTB zeigten eine um das 160fach niedrigere Aktivität mit der PsL als mit der rTfH (Kap. 5.2.2.3), welches darauf hindeuten könnte, dass auch im hochmolekularen Bereich solche Estergruppen mit aromatischen Strukturelementen in der direkten Umgebung von der PsL schlechter hydrolysiert werden als von der rTfH.

5.2.3.2 Vergleich der Polyesterspaltprodukte

Die Analyse der bei der Hydrolyse entstandenen Spaltprodukte lässt ebenfalls Rückschlüsse zum Enzymmechanismus an der Polymeroberfläche zu. Aus Abb. 5-23 ist der typische Verlauf des Abbaus eines SP 4/6 Films mit den Enzymen PsL und rTfH zu entnehmen. Während sich der SP 4/6 Abbau mit dem Enzym PsL bereits ab 40 % der Esterspaltungen deutlich verlangsamt, war analog zur wTfH [Kleeberg et al. 2005] bei der rTfH eine vollständige Hydrolyse der Polyesterketten in ihre monomeren Bestandteile zu erkennen. In beiden Fällen war eine vollständige Auflösung der Polyesterfilme zu beobachten, was bedeutet, dass die von der PsL nicht gespaltenen Estergruppen offenbar in wasserlöslichen Intermediaten vorlagen. Demnach ist ein Überbleiben von kristallinen Domänen oder die Deaktivierung des Enzyms, die die verlangsamte Hydrolyse der Estergruppen bei PsL erklären könnten, auszuschließen.

Ein Grund für das unterschiedliche Spaltungsverhalten könnte der Spaltmechanismus der Enzyme sein. Enzyme, die Polymerketten abbauen, werden allgemein in *exo*- und *endo*-Enzyme unterschieden, wobei ein *exo*-Abbau immer von den Kettenenden aus erfolgt. Beim *endo*-Abbau werden die Estergruppen statistisch innerhalb der gesamten Polymerkette hydrolysiert. Unter der Annahme, dass PsL als *Exo*-Hydrolase vom Kettenende aus Dimere abtrennt, ließe sich der beobachtete Verlauf erklären. So findet man beispielsweise bei

celluloseabbauenden Mikroorganismen unter anderem die *Exo*- β -1,4-Glucanasen, die vom Kettenende aus das Disaccharid Cellobiose abspalten [Schlegel 1992]. Baut die PsL hingegen die Polymerkette im *endo*-Mechanismus ab, lässt sich das hier gefundene Abbauverhalten nur in Zusammenhang mit der für PsL vorliegenden Grenzflächenaktivierung deuten (Kap. 5.2.2.3). Es konnte gezeigt werden, dass PsL im Gegensatz zur rTfH grenzflächenaktiviert ist und somit in Gegenwart wasserunlöslicher, hydrophober Ester signifikant höhere Aktivitäten aufweist als gegenüber wasserlöslichen Estersubstraten. Wahrscheinlich wäre daher, dass die im Verlauf eines postulierten *endo*-Abbaus generierten statistisch erzeugten Oligoester sich von der Filmoberfläche ablösen und in Lösung nicht mehr durch PsL angegriffen werden können, da hier die notwendige hydrophobe Oberfläche für die Enzymaktivierung fehlt.

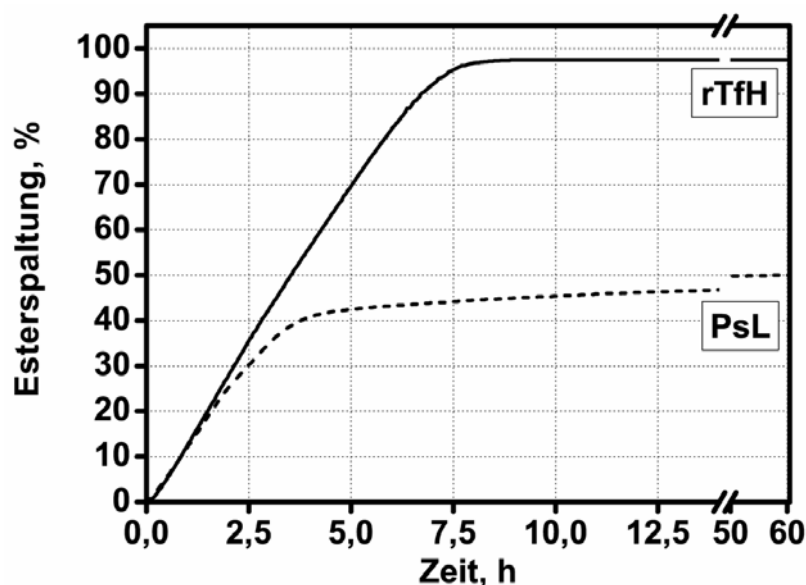


Abb. 5-23: Abbau eines SP 4/6 Films (\varnothing 12 mm) mit rTfH ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) und PsL ($54 \mu\text{g mL}^{-1}$) bei 40°C in 0,9 % NaCl-Lösung.

Bezüglich der rTfH kann für den beobachteten Verlauf der Kurve ähnlich zur PsL sowohl der *endo*- als auch der *exo*-Mechanismus postuliert werden. Bei einem *exo*-Abbau würde man erwarten, dass rTfH vom Kettenende aus Monomere abtrennt, welches letztendlich in einem vollständigen Umsatz der Estergruppen im Polyester resultiert. Im Falle eines *endo*-Abbaus ist das Abbauverhalten wieder in Zusammenhang mit der Grenzflächenaktivierung der Enzyme zu diskutieren. Da bei der rTfH keine Grenzflächenaktivierung festgestellt wurde, würden die während des Polyesterabbaus gebildeten wasserlöslichen Intermediate anders als bei PsL auch hydrolysiert werden.

Um zu untersuchen, ob ein *endo*- oder ein *exo*-Abbau vorliegt, wurde die Entstehung von Polyesterspaltprodukten während des enzymatischen Abbaus des aliphatischen Polyesters SP 4/6 mittels Gelpermeationsschromatographie (GPC) analysiert (Kap. 4.8.6). Die Messungen zeigten, dass bei rTfH der Polymerpeak des SP 4/6 Films im Chromatogramm nach 5,25 h nahezu vollständig verschwunden war (Abb. 5-24). Zudem waren noch wenige oligomere Bruchstücke zu erkennen, deren Molekulargewichte im Zuge des Abbaus weiter abnahmen, jedoch nicht vollständig in ihre wasserlöslichen Monomere hydrolysiert wurden.

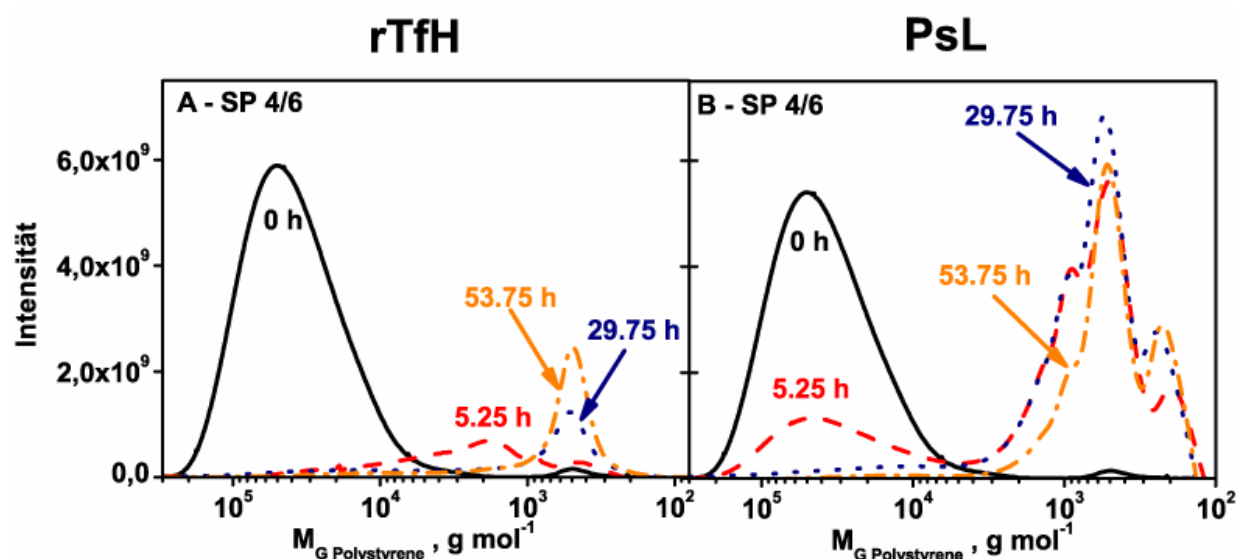


Abb. 5-24 GPC-Chromatogramm des Abbaus eines SP 4/6 Films durch die Enzyme rTfH (A) und PsL (B). Der Polyesterabbau erfolgte bei einer rTfH- und PsL-Enzymkonzentration von 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. 54 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,2 und 30 °C. Die Chromatogramme wurden basierend auf der eingesetzten Polyestermasse zum Zeitpunkt $t=0$ h normiert. GPC-Chromatogramm nach 0 h (—), 5,25 h (---), 29,75 h (· · ·) und 53,75 h (- · -) Abbau.

Der SP 4/6 Filmabbau mit PsL zeigte hingegen ein vollkommen anderes Bild. Zwar war vergleichbar zur rTfH, eine sichtbare Reduktion des Polymerpeaks nach 5,25 h erkennbar, jedoch entstand parallel zur Abnahme des Polymerpeaks ein Oligomerpeak mit einer Molekulargewichtsverteilung von etwa 100 g mol^{-1} bis 4000 g mol^{-1} , der auch nach dem vollständigen Verschwinden des Polymerpeaks nur geringfügig kleiner wurde.

Diese Ergebnisse stützen die oben formulierte Hypothese, dass der Abbau der Polyesterketten bei beiden Hydrolasen über den *endo*-Mechanismus erfolgt. Bei einem *exo*-Mechanismus hätte es sowohl bei der rTfH als auch bei PsL zu keiner Bildung eines Oligomerpeaks kommen dürfen. Beim Abbau mit PsL werden daher wohl wasserlösliche oligomere

Intermediate gebildet, die aufgrund der vorliegenden Grenzflächenaktivierung des Enzyms dann nicht oder nur sehr langsam weiter in Monomere hydrolysiert werden können. Mit rTfH ist diese Akkumulation von Intermediaten nicht zu beobachten, was so interpretiert werden könnte, dass rTfH auch in der Lage ist wasserlösliche Estersubstrate anzugreifen.

Um mögliche Unterschiede im Spaltmechanismus zu finden, wurde zusätzlich das Hydrolyseverhalten eines höher schmelzenden aliphatisch-aromatischen Copolyesters untersucht. Im Gegensatz zum SP 4/6 Film Abbau wurden die Experimente nicht bei einer Messtemperatur von 30 °C sondern bei 55 °C durchgeführt. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Temperaturdifferenz ΔT_{mt} ebenfalls 30 °C betrug und somit prinzipiell eine ähnliche Kettenmobilität auf der Polymeroberfläche vorliegen müsste.

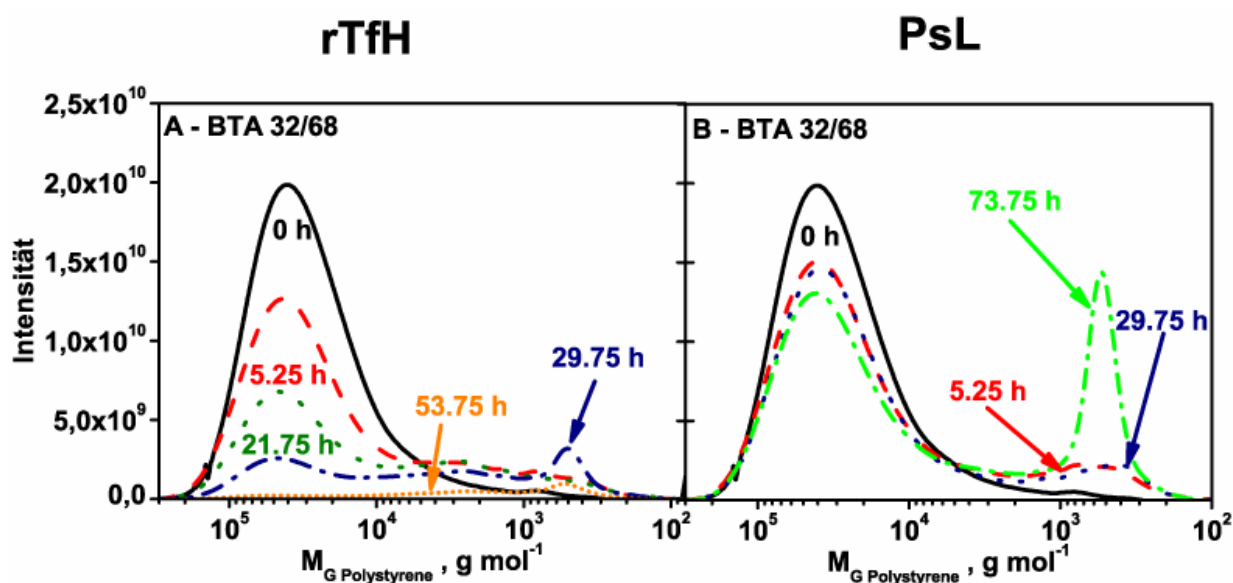


Abb. 5-25 GPC Chromatogramm des Abbaus eines BTA 32/68 Films durch die Enzyme rTfH (A) und PsL (B). Der Polyesterabbau erfolgte bei einer rTfH- und PsL-Enzymkonzentration von 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. 54 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,2 und 55 °C. Die Chromatogramme wurden basierend auf der eingesetzten Polyestermasse zum Zeitpunkt $t=0$ h normiert. **A:** GPC-Chromatogramm nach 0 h (—), 5,25 h (---), 21,75 h (···), 29,75 h (- · -) und 53,75 h (····) Abbau. **B:** GPC-Chromatogramm nach 0 h (—), 5,25 h (---), 29,75 h (···) und 73,75 h (- · · -) Abbau.

Der Abbau des BTA 32/68 Films mit rTfH und PsL bei einer Inkubationstemperatur von 55 °C ist in Abb. 5-25 dargestellt. Der Abbau verlief deutlich langsamer als die Hydrolyse des rein aliphatischen SP 4/6 Films. Bei beiden Enzymen war eine Reduktion des Polymerpeaks zu erkennen, wobei der Abbau mit PsL deutlich langsamer verlief als mit rTfH. Bei der rTfH

war der Polymerpeak nach 53,75 h fast vollständig verschwunden, während bei PsL nach 73,75 h noch ca. 70 % des ursprünglichen Polyesters vorhanden waren.

Die Oligomerverteilung beim Abbau mit rTfH ähnelte der des SP 4/6 Abbaus. Nur geringe Mengen an Oligomeren waren im Chromatogramm sichtbar. Ein anderes Bild ergab sich bei PsL, wo sich die Verteilung der Spaltprodukte deutlich von der des aliphatischen Polyesters SP 4/6 unterschied. Nur kleine Mengen an Spaltprodukten wurden beim Abbau des BTA 32/68 Films gebildet, die im Verlauf des Abbaus geringfügig zunahmen. Dies ist vermutlich auf die geringe Hydrolyserate des aliphatisch-aromatischen Copolyesters zurückzuführen. Im Vergleich zum Abbau des aliphatischen Polyesters zeigen die Experimente, dass die Polyesterketten des BTA 32/68 wohl im *endo*-Mechanismus abgebaut werden.

Der langsamere Abbau des BTA 32/68 Films kann in den vorliegenden Messungen nicht auf die geringere Mobilität der Polyesterketten an der Polymeroberfläche zurückgeführt werden, da ΔT_{mt} vergleichbar war. Daher sind die Unterschiede offenbar wie bereits näher erläutert mit der sterischen Kompabilität des aktiven Zentrum und der chemischen Umgebung der Estergruppe in Zusammenhang zu bringen (Kap. 5.2.2.3). Allerdings erklärt dies nicht, weshalb PsL nicht wie beim SP 4/6 Abbau den Polymer nicht vollständig in wasserlösliche Oligomere umsetzt. Möglich wäre, dass während des hydrolytischen Abbaus der Polyesterketten die entstehenden freien Kettenenden (freie Hydroxyl- und Carboxylgruppen) die Polyesteroberfläche hydrophilisieren. Als Folge dessen könnte dies die für die PsL notwendige hydrophobe Grenzflächenaktivierung verhindern. Des Weiteren könnte die PsL vornehmlich Estergruppen in aliphatischen Bereichen hydrolysieren, was zu einer „Verkrustung“ der Polymeroberfläche mit hauptsächlich aromatischen Strukturelementen führen würde. Da aus den Messungen mit wasserlöslichen aromatischen Estern bekannt ist, dass PsL Ester mit aromatischer Strukturkomponente deutlicher langsamer hydrolysiert, könnte dies die verlangsamte Spaltung der Estergruppen an der Polymeroberfläche erklären.

5.2.4 Enzymatische Hydrolyse von PET-Nanopartikeln

Die sich in den vorangegangenen Kapiteln bereits gezeigten Unterschiede im Hydrolyseverhalten von PsL und rTfH gegenüber Polyestern zeigten sich besonders beim Abbau aliphatisch-aromatischer Copolyester. Kürzlich wurde demonstriert, dass, obwohl PET bisher als resistent gegenüber dem biologischen Abbau galt, sowohl PET-Nanopartikel als auch PET-Filme durch die Hydrolase aus *Thermobifida fusca* hydrolysiert werden können [Welzel 2003, Müller et al. 2005]. Weiterhin zeigten andere Publikationen, dass eine

Oberflächenmodifikation von PET durch Hydrolasen wie zum Beispiel Cutinasen möglich ist [Alisch-Mark et al. 2006, Silva et al. 2005].

Die bei Welzel [2003] beschriebenen Abbauprobe mit PET-Nanopartikeln wurden mit der rTfH und der PsL bei 55 °C wiederholt, um einen direkten Vergleich beider Enzyme zu ermöglichen. In Abb. 5-26 sind die Abbaukurven beider Enzyme zusammengefasst.

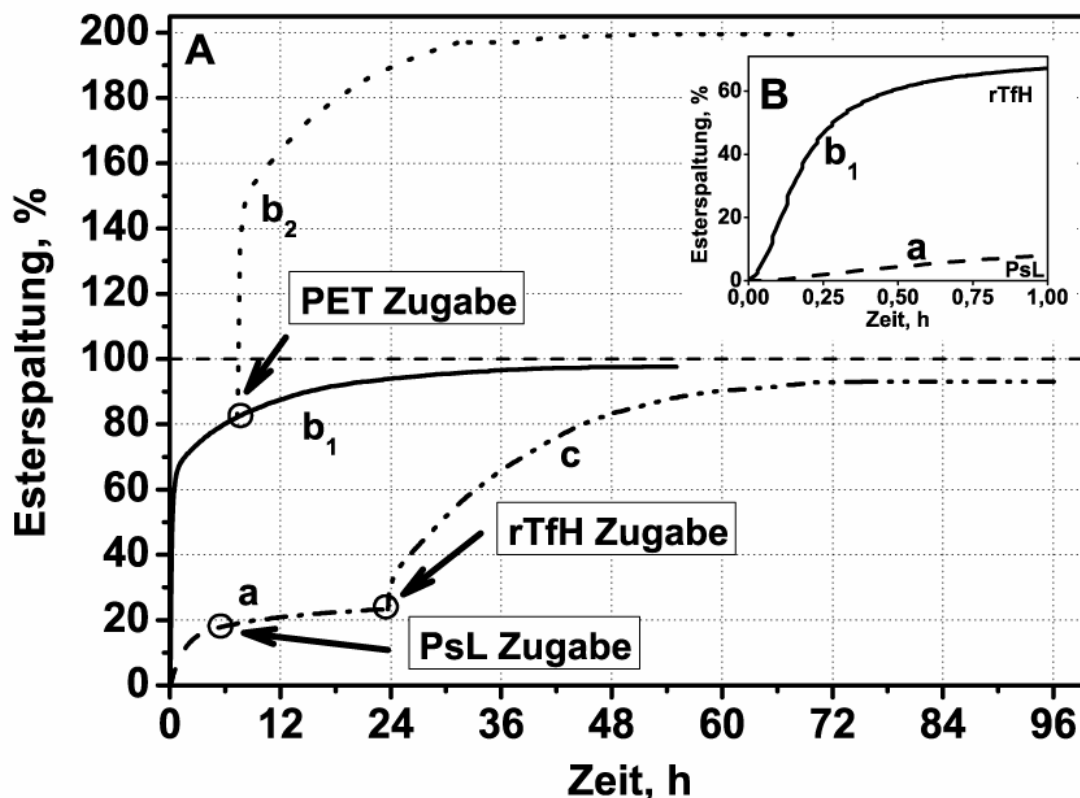


Abb. 5-26: Abbau von 0,7 mg PET-Nanopartikeln ($\varnothing 92 \pm 5$ nm) mit PsL (a) und rTfH (b_1 , b_2 , c) unter oberflächenkontrollierenden Bedingungen bei 55 °C. In Abbildung B ist der Abbau des PETs innerhalb der ersten Stunde dargestellt. Enzymkonzentration für PsL betrug $41,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ und für rTfH $84,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. **a:** Abbau der PET-Nanopartikel mit PsL (—) und nach erneuter Zugabe von PsL (— · —); **b₁:** Abbau der PET-Nanopartikel mit rTfH (—); **b₂:** Wiederholung von b_1 und erneute Zugabe von PET-Nanopartikel (· · ·) nach 7,5 h Abbau; **c:** erneute Zugabe von rTfH zum PET-Nanopartikelabbau mit PsL (— · · —)

Innerhalb eines Tages baute rTfH die PET-Nanopartikel (b_1) nahezu vollständig ab. Nach 30 min waren bereits etwa 60 % der Estergruppen hydrolysiert. Eine erneute Zugabe von PET-Nanopartikeln (b_2) nach 7,5 h bei einer Wiederholung des Versuches zeigte erneut eine hohe Hydrolyseaktivität, die mit dem Verlauf der Kurve b_1 vergleichbar war und belegte, dass das Abflachen der Kurve nicht auf eine Deaktivierung der rTfH zurückzuführen war. Dies bestätigt die hohe Temperaturstabilität der rTfH, für die bei 55 °C eine Halbwertszeit von

$t_{1/2}$ =84 h beschrieben wurde (Kap. 5.2.2.1). PsL (a) zeigte demgegenüber eine vergleichsweise niedrige Aktivität gegenüber PET-Nanopartikeln. Die Anfangsabbauraten unterschieden sich um einen Faktor von 20 und der PET-Nanopartikelabbau stagnierte nach ca. 20 % Esterspaltung. Um eine temperaturbedingte Inaktivierung der PsL ($t_{1/2}$ =9 h bei 55 °C, siehe Kap. 5.2.2.1) auszuschließen, wurde nach 5,5 h nochmals die gleiche Enzymmenge hinzugegeben, was jedoch zu keiner Fortsetzung des Abbauprozesses führte. Durch Zugabe von neuen PET-Nanopartikeln nach 23,4 h (Kurvenverlauf nicht dargestellt) konnte nachgewiesen werden, das PsL auch in der Stagnationsphase aktiv war, allerdings betrug die hier beobachtete Restaktivität nur ca. 40% der Ausgangsaktivität. Nach weiteren 15 % Esterspaltung stagnierte aber auch dieser Abbau. Fügt man jedoch rTfH (c) zu dem stagnierenden PsL-Abbau hinzu, begann der Abbau der PET-Nanopartikel wieder, bis ein vollständiger Abbau nach ca. 2½ h erreicht wurde. Die relativ niedrige Aktivität im Vergleich zum PET-Nanopartikelabbau mit reiner rTfH (b_1) lässt sich unter Umständen auf konkurrierende Adsorption mit der PsL zurückführen, die die Konzentration an rTfH an der Polyester Oberfläche reduzierte und so den Abbau verlangsamte.

Um das abweichende Abbauverhalten beider Enzyme näher zu studieren, wurden Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahmen von nativen PET-Suspensionen und von PET-Nanopartikeln nach einem ca. 20%igen Abbau der PET-Nanopartikel im Labor von Dr. Heinrich Lünsdorf angefertigt (Abb. 5-27). Die PET-Nanopartikel in der TEM Aufnahme vor dem Abbau weisen eine deutlich vernetzte Struktur auf. Bei dieser kolloidartigen Struktur kann es sich nur um Artefakte handeln, die sich während der TEM Probenaufarbeitung (Trocknung) gebildet haben. Vor den Abbautests ergaben Messungen der PET Partikelgrößen mittels dynamischer Lichtstreuung im nativ-suspendierten Zustand einen mittleren Durchmesser von 92 nm. Die Methode der dynamischen Lichtstreuung beruht auf der Erfassung der Teilchendiffusion aufgrund der Brownsche Molekularbewegung. Aus der ermittelten Diffusionsgeschwindigkeit wird die Partikelgröße errechnet. Ein Vorliegen kolloidaler Strukturen im suspendierten Zustand der PET-Nanopartikel kann aufgrund dieser Ergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden.

Die TEM-Aufnahmen zeigen, dass die Partikel nach dem partiellen Abbau mit der rTfH kein Aggregationsverhalten mehr aufweisen. Dies lässt sich auf eine Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit zurückführen. So zeigt sich um die Partikel herum ein schwarzer Hof, bei dem es sich unter Umständen um adsorbierte rTfH Moleküle handeln könnte, die

einen Kontakt der hydrophoben Polyesteroberflächen verhindern. Auch ein Abbau einer äußeren amorphen Schale der Partikel würde ein „Ineinanderfließen“ der Partikel verhindern, da hierzu mobile, im amorphen Zustand vorliegende Polymerketten notwendig sind (Dies entspricht dem Prinzip von Dispersionsfarben.) Die Bestimmung der Partikeldurchmesser nach dem Abbau mit rTfH ergibt einen Mittelwert von 62 nm, der mit dem theoretisch berechneten Partikeldurchmesser nach 20 %igem Abbau übereinstimmt.

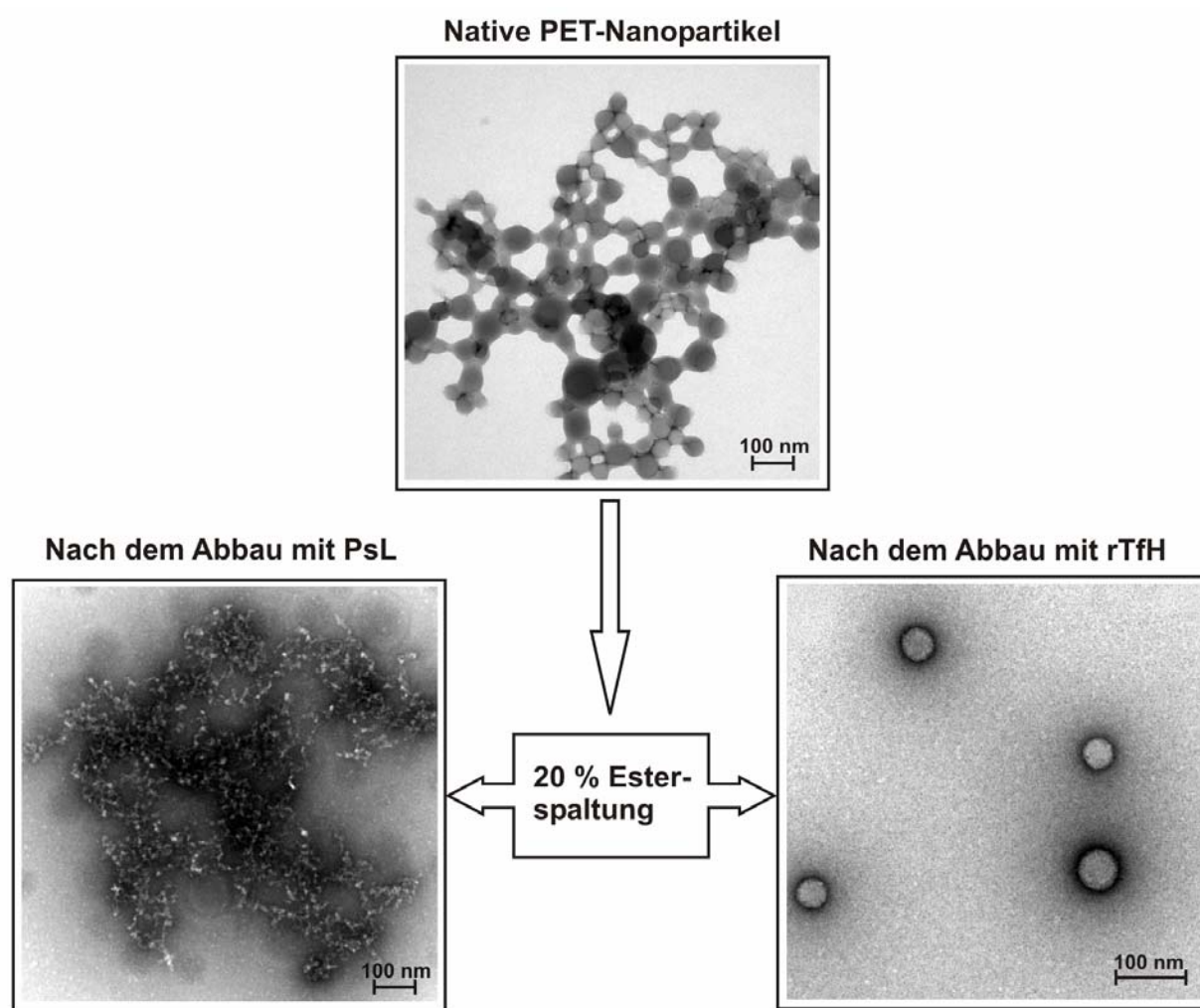


Abb. 5-27: TEM-Präparate von nativen PET-Nanopartikeln und PET-Nanopartikeln nach einem ca. 20%igen Abbau mit PsL und rTfH. 0,7 mg PET-Nanopartikel wurden bei 55 °C und pH 7 abgebaut. Durch Zugabe von entweder 41,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PsL oder 84,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ rTfH wurde der Abbau initiiert und nach 20 % der Esterspaltung durch Absenken des pH Wertes auf 4,0 mit 0,1 M HCl gestoppt.

Zudem war im Vergleich zu nativen PET-Nanopartikeln der Hintergrund der TEM-Aufnahme strukturiert. Da die Messung unter Enzymüberschuss durchgeführt wurde, könnte es sich hierbei um rTfH-Moleküle handeln. Eine grobe Abschätzung der Strukturdimension ergab einen Wert von ca. 2-4 nm, was in der Größenordnung der Dimension der Hydrolase liegt. Eine Verursachung der Hintergrundtextur durch PET-Spaltprodukte oder Salzlückstände aus der Enzymlösung ist jedoch nicht auszuschließen.

Die TEM-Aufnahme der Partikel nach dem enzymatischen Angriff durch PsL unterscheidet sich deutlich von der der rTfH. Es sind, trotz des nur ca. 20 %igen Abbaus, keinerlei Strukturen mehr vorhanden, die mit den PET-Nanopartikeln vergleichbar wären. Hingegen sind Aggregate mit kleineren Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 10-20 nm in der mikroskopischen Aufnahme erkennbar. Um die Aggregate herum sind kreisrunde Schatten zu beobachten, deren Durchmesser denen der nativen PET Nanopartikel vor dem Abbau entsprechen. Im Gegensatz zu rTfH scheint PsL die Partikel nicht gleichmäßig von der Oberfläche her abzubauen. Die Partikel werden durch den enzymatischen Abbau in kleinere nicht mehr weiter abbaubare Fragmente zerlegt, die dann die beobachteten, diffusen Aggregate bilden.

Deuten ließen sich die beschriebenen Versuchsergebnisse durch unterschiedliche Aktivitäten beider Enzyme gegenüber kristallinen Bereichen der Polyester, in denen wenig mobile Polymerketten vorliegen. Aus dem zweistufigen Verlauf der Abbaugeschwindigkeiten sowie aus den Aggregatstrukturen der TEM-Aufnahmen lässt sich schließen, dass PET-Nanopartikel nicht, wie für rein aliphatische Polyester beschrieben [Herzog et al. 2006], in rein amorpher Form, sondern teilkristallin, vorliegen. rTfH baut amorphe wie auch kristalline Domänen mit einer Geschwindigkeit in vergleichbarer Größenordnung ab, somit kommt es zu keiner signifikanten Anreicherung von kristallinem Polyester während des Abbaus. Beide morphologischen Strukturen werden relativ gleichmäßig parallel von der Oberfläche her abgebaut. PsL kann hingegen im Wesentlichen nur amorphe Strukturen des PETs abbauen. Da in Nanopartikeln aufgrund der kleinen Dimensionen und der daraus resultierenden großen Oberfläche ein Großteil des amorphen Materials, das die kristallinen Domänen verbindet, für das Enzym zugänglich ist, wird ein großer Teil amorphen Materials abgebaut und die PET-Kristallstrukturen bleiben als „Trümmer“ der PET-Nanopartikel zurück.

Beim Abbau von PET-Filmen [Müller et al. 2005] zeigt sich offenbar eine analoge Situation. Hier reicht sich mit PsL nach dem anfänglichen Abbau der an der Oberfläche präsenten

amorphen Strukturen kristallines PET an. Nur rTfH, das auch kristallines PET mit hinreichender Geschwindigkeit hydrolysieren kann, bewirkt einen weiteren Abbau des Filmmaterials, während der Abbau durch PsL schon sehr schnell durch die Abschirmung des restlichen Filmes durch kristallines Material stoppt. Der anfängliche Abbau oberflächlicher amorpher Bereiche ist aufgrund des geringen Anteils im Verhältnis zur Gesamtmasse des Filmes in Versuchen üblicherweise nicht messbar.

5.2.5 Enzymatische Hydrolyse von Poly(3-Hydroxybutyrat)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dP(3HB) verwendet, um Abbauversuche mit der extrazellulären dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 aus *Paucimonas lemoignei* im Vergleich mit den Hydrolasen rTfH und PsL durchzuführen. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass aufgrund des hohen Schmelzpunktes von dP(3HB) dieses Polymer üblicherweise nicht von anderen Hydrolasen (z.B. Lipasen) hydrolysiert wird [Jaeger et al. 1995, Mukai et al. 1993a]. dP(3HB)-Depolymerasen sind jedoch im Gegensatz zur PsL ([Marten et al. 2003] und Kap. 5.2.3.1) und rTfH (Kap. 5.2.3.1) trotz einer sehr hohen Temperaturdifferenz ΔT_{mt} von 143 °C in der Lage, dP(3HB)s effektiv abzubauen. Aufgrund dieser Beobachtungen ist zu vermuten, dass der Abbau mit dP(3HB)-Depolymerasen anderen Mechanismen unterliegt als das für Hydrolasen wie PsL und rTfH der Fall ist. Da aber Depolymerasen und Hydrolasen ein grundsätzlich gleicher enzymatischer Reaktionsmechanismus zu Grunde liegt, der sich in den für α/β -Hydrolasen typischen katalytischen Triade Ser-Asp-His im aktiven Zentrum begründet, sind Gründe für die mechanistischen Unterschiede in der Enzymadsorption an der hydrophoben Oberfläche oder in der Substraterkennung zu vermuten. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, welche strukturellen und mechanistischen Unterschiede bei der Hydrolyse von dP(3HB) zwischen der dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5, der rTfH und der PsL bestehen. Zunächst wurde die PhaZ5-Aktivität gegenüber dP(3HB)-Materialien in verschiedenen Formen (Nanopartikel, Granula, Film) bestimmt (Abb. 5-28). Die Messungen wurden bei einer PhaZ5 Konzentrationen von 0,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Der Abbau der dP(3HB)-Nanopartikel war schon innerhalb von wenigen Sekunden beendet. Hier erfolgte der Abbau so schnell, dass das verwendete Titrationssystem zu träge war, um die freiwerdenden Säuren sofort zu neutralisieren. Daher wird wahrscheinlich die tatsächliche Abbaurate höher als die ermittelte von 11,8 $\mu\text{mol min}^{-1}$ sein. Im Falle der Nanopartikel wurden ca. 70 % der in den Proben enthaltenen Estergruppen im dP(3HB) gespalten. Der Abbau von dP(3HB)-Granula unterteilte sich in zwei Phasen. In der ersten Phase war eine

hohe PhaZ5-Aktivität (Abbaurrate: $0,24 \mu\text{mol min}^{-1}$) zu beobachten, in der ca. 40 % der verfügbaren Gesamttergruppen innerhalb von 30 min gespalten wurden. Nach einer kurzen Übergangsphase folgte die zweite Phase (Abbaurrate: $0,03 \mu\text{mol min}^{-1}$), die durch einen kontinuierlich zunehmend abflachenden Verlauf gekennzeichnet war. Nach Abbruch der Messung waren ca. 55 % der verfügbaren Estergruppen im Probenmaterial gespalten. Über die Gesamtsterspaltungshöhe kann für den dP(3HB)-Film aufgrund des langsamen Abbaus (Abbaurrate: $0,01 \mu\text{mol min}^{-1}$) keine Aussage getroffen werden. Nach 20 h Inkubation lag hier die Gesamsterspaltungshöhe deutlich unterhalb 10 %. Zusammenfassend zeigen die Abbauprobungen, dass bei den eingesetzten Materialien drastische Aktivitätsunterschiede zu beobachten sind, wobei der höchste Abbau gegenüber Nanopartikeln gemessen wurde, gefolgt von der Hydrolyse der Granula und des Filmes.

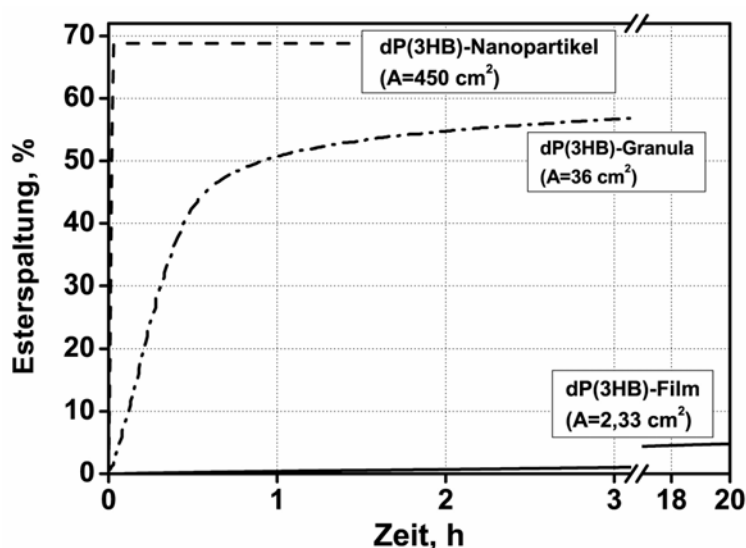


Abb. 5-28: Abbau von verschiedenen dP(3HB)-Materialien bei 37 °C und pH 8 in milliQ-H₂O. Die PhaZ5 Proteinkonzentration betrug $0,83 \mu\text{g mL}^{-1}$. Als dP(3HB)-Materialien wurden 0,85 mg Nanopartikel (\varnothing 95 nm), 1 Film (\varnothing 12 mm, 170 μm dick) und 1 mg Granula (\varnothing 1,39 μm) verwendet.

Beim Abbau von Granula und Nanopartikeln mit PhaZ5 wurde kein vollständiger Abbau (100 % Esterspaltung) erreicht, dieser lag nur zwischen 55 % bzw. 70 % Spaltung der vorhandenen Estergruppen. Möglicherweise ist dies auf eine Enzyminaktivierung während des Abbaus zurückzuführen. Allerdings wurde beim Filmabbau noch nach 20 h eine PhaZ5-Aktivität gemessen. Dies spricht eher gegen eine Enzyminaktivierung. Eine zweite Erklärung besteht, wie bei der Lipase PsL, in einer möglichen unterschiedlichen Aktivität von PhaZ5 gegenüber wasserlöslichen und nicht wasserlöslichen dP(3HB)-Spaltprodukten. Sowohl bei

den Nanopartikeln als auch beim Granula waren nach Abbruch der Messungen keine Partikel im Reaktionsgefäß sichtbar. Somit ging das wasserunlösliche feste dP(3HB)-Material offenbar weitestgehend in wasserlösliche dP(3HB)-Spaltprodukte über. Aus Publikationen zur Enzymaktivität von PhaZ5 gegenüber dP(3HB)-Spaltprodukten ist bekannt, dass die Hydrolyse von wasserlöslichen 3HB-Oligomeren (besonders bei den Dimeren und Trimeren) signifikant langsamer verläuft als die Hydrolyse vom festen Polymer [Jendrossek und Handrick 2002]. Demnach befinden sich wahrscheinlich zum Abbauende hin größtenteils Monomere, Dimere und Trimere im Reaktionsansatz, deren Estergruppen deutlich langsamer hydrolysiert werden als die Estergruppen im festen Material.

Der Abbau der verschiedenen dP(3HB)-Materialien scheint mit der verfügbaren Polyesteroberfläche zu korrelieren und steigt bei gleicher Proteinkonzentration ($0,83 \mu\text{g mL}^{-1}$) mit zunehmender Polyesteroberfläche an (Abb. 5-28). Bei dP(3HB)-Depolymerasen wird nicht, wie bei den Lipasen, bei Erreichen der maximalen Enzymbelegung auf der Polyesteroberfläche eine Stagnation der Abbaurate beobachtet, sondern meist tritt eine deutliche Abnahme der Abbaugeschwindigkeit bereits vor Erreichen des maximalen Belegungsgrades auf (Kap. 3.4 und [Mukai et al. 1993b, Timmins et al. 1997]), die unter Umständen Ursache für die hohen Aktivitätsunterschiede sein könnte. Unter der Annahme, dass die zugefügte Proteinmenge von $5 \mu\text{g}$ vollständig auf der dP(3HB)-Oberfläche adsorbiert, ergäbe sich für den Film eine Enzymbelegung von $2,14 \mu\text{g cm}^{-2}$, für die Granula und die Nanopartikel entsprechend von $0,14 \mu\text{g cm}^{-2}$ und $0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$. Nach Tonford [1961] kann für PhaZ5 (Molekulargewicht von 50 kDa) eine maximale theoretische Enzymbelegung von $0,3 \mu\text{g cm}^{-2}$ abgeschätzt werden (vgl. Anhang). Dies bedeutet, dass die Oberfläche beim dP(3HB)-Film Abbau wahrscheinlich maximal mit Enzym belegt war, die für dP(3HB)-Depolymerasen typische Enzyminhibierung auftrat und Ursache für die geringe Abbaugeschwindigkeit ist. Der Abbau der Granula und Nanopartikel hingegen erfolgte entsprechend der Abschätzung nach Tonford [1961] unter enzymlimitierenden Bedingungen, d.h. die Oberfläche war nicht vollständig mit PhaZ5 belegt, und eine Enzyminhibierung sollte nicht auftreten. Demnach würde man hier prinzipiell gleiche Abbauraten erwarten. Ein Grund für die deutlich höheren Abbaugeschwindigkeiten bei den Nanopartikeln könnte die physikalische Beschaffenheit der Nanopartikel sein. So konnte Herzog et al. [2006] zeigen, dass Nanopartikel aliphatischer Polyester im Gegensatz zu teilkristallinen Polyesterfilmen keine Abhängigkeit der Abbaurate von der Temperaturdifferenz ΔT_{mt} aufweisen. Die Autoren

schlussfolgerten aus diesen Beobachtungen, dass unabhängig von der Messtemperatur eine maximal mögliche Kettenmobilität auf der Oberfläche der Nanopartikel vorliegt, was als amorpher Zustand interpretiert wird. Dieser amorphe Zustand, welcher möglicherweise auch bei den aliphatischen dP(3HB)-Nanopartikel vorliegt, könnte den schnellen Abbau der Partikel im Vergleich zu den Granula erklären. Das würde wiederum bedeuten, dass analog zu den Lipasen, die Mobilität der Polyesterketten auch beim Abbau des dP(3HB) durch dP(3HB)-Depolymerasen eine wichtige Rolle bei der enzymatischen Hydrolyse zu spielen scheint. Durch eine höhere Flexibilität der Polyesterkette kann diese leichter in das aktive Zentrum gelangen und dort hydrolysiert werden.

Aus der Abb. 5-28 geht eindeutig hervor, dass das von Marten et al. [2003] gefundene Modell der Kettenmobilität, welches die Abbaugeschwindigkeit von Polyestern durch Lipasen mit der Temperaturdifferenz zwischen Schmelzpunkt und Abbautemperatur (ΔT_{mt}) korreliert, für PhaZ5 bei erster Betrachtung nicht gültig ist. ΔT_{mt} lag bei den durchgeführten Messungen bei 143 °C und somit deutlich über dem Wert von 30 °C, der bei anderen aliphatischen Polyestern als Grenzwert für eine signifikante Abbaugeschwindigkeit beobachtet wurde. Bei derart hohen ΔT_{mt} -Werten sollte eigentlich kein messbarer Abbau von dP(3HB) zu beobachten sein. Allerdings lässt sich aufgrund des hohen dP(3HB)-Polyesterschmelzpunktes von $T_m=180$ °C diese Vermutung nicht direkt nachvollziehen, da ein eventueller doch vorhandener überproportionaler Anstieg der Abbaugeschwindigkeit bei Annäherung an den Schmelzpunkt nicht direkt zu messen ist, da ein enzymatischer Abbau im für die Messungen notwendigen Messbereich ab 140 °C nicht zu realisieren ist. Die hohe Aktivität gegenüber den Nanopartikeln lässt jedoch vermuten, dass sich eine erhöhte Mobilität der Polyesterketten positiv auf die Abbaurate der dP(3HB)-Depolymerasen auswirkt und PhaZ5 doch sensitiv in Bezug auf die Kettenmobilität des hochmolekularen Substrates dP(3HB) ist.

Eine entscheidende Einflussgröße, die den offensichtlichen Widerspruch zwischen Sensitivität für Kettenmobilität und der schnellen Hydrolyse des hochschmelzenden dP(3HB)s lösen würde, ist unter Umständen in der für dP(3HB)-Depolymerasen beschriebenen molekülspezifischen Interaktion der Substratbindedomäne (SBD) mit der dP(3HB)-Oberfläche (Kap. 3.4) zu sehen. So wird vermutet, dass durch die Adsorption der Hydrolase an der dP(3HB)-Oberfläche sich die Bindungseigenschaften der Polyesterketten im Polymerverbund verändern [Murase et al. 2002, Kikkawa et al. 2004]. Diese Interaktion kann mit einem Weichmachereffekt der Bindungsdomäne verglichen werden, wodurch der Schmelzpunkt

kristalliner Bereiche in der Umgebung der Adsorptionstelle erniedrigt und die Kettenmobilität dementsprechend erhöht wird. So wären dP(3HB)-Depolymerasen in Hinsicht auf den Hydrolysemechanismus im aktiven Zentrum durchaus vergleichbar mit Lipasen während die außergewöhnlich hohen Aktivitäten gegenüber dP(3HB) durch den speziellen Adsorptionsmechanismus hervorgerufen werden.

In der Literatur wurde gezeigt, dass die Adsorption von dP(3HB)-Depolymerasen nur an kristallinen und glasartig erstarrten Domänen stattfindet [Yamashita et al. 2001, Kikkawa et al. 2004, Scandola et al. 1997, Abe et al. 1995, Focarete et al. 1998, He et al. 2001]. Die sich anschließende Hydrolyse erfolgt aber zunächst hauptsächlich in amorphen Regionen und später auch in kristallinen Bereichen. Untersuchungen mit den dP(3HB)-Depolymerasen aus *Ralstonia pickettii* T1 und *Pseudomonas lemoignei* zeigten, dass rein amorphes, ataktisches dP(3HB) erst dann enzymatisch hydrolysiert wird, wenn dieses in einem Blockpolymer mit kristallinen oder glasartig erstarrten Polyestern polymerisiert ist [Abe et al. 1995, Scandola et al. 1997]. Die Autoren führten diese Beobachtungen darauf zurück, dass bei den untersuchten dP(3HB)-Depolymerasen nur eine Adsorption an geordneten Regionen stattfinden kann. Somit scheint sich die Adsorption der dP(3HB)-Depolymerasen auf kristalline oder glasartig erstarrte amorphe Domänen im Polymer zu beschränken.

Weiterhin konnte Herzog et al. [2006] zeigen, dass sich die Polyesterketten diverser aliphatischer Polyester in Nanopartikeln in einem Zustand erhöhter Beweglichkeit befinden. Sollte dies auch für dP(3HB)-Nanopartikel zutreffen, wäre eigentlich zu erwarten, dass dP(3HB)-Nanopartikel aufgrund der fehlenden Adsorptionsstellen nicht bzw. deutlich langsamer als teilkristalline Proben (Filme und Granula) abgebaut werden, was den oben gezeigten Messergebnissen widersprechen würde. Aufgrund der niedrigen Glastemperatur ($T_G = 4^\circ\text{C}$ für kristallines dP(3HB) [Doi 1990]) sollten die Polyesterketten in den Nanopartikeln auch nicht glasartig erstarrt vorliegen. Ein Erklärungsansatz für diesen scheinbaren Widerspruch könnte darin gesehen werden, dass dP(3HB)-Nanopartikel doch nicht vollkommen amorph vorliegen (was auch für Nanopartikel von verschiedenen aromatischen Polyestern zutrifft [Welzel 2003]), und neben amorphen Bereichen auch kristalline Strukturen vorhanden sind.

Um diesen Punkt zu klären, wurde das Abbauverhalten der PhaZ5 gegenüber offenbar rein amorphen Nanopartikeln und teilkristallinen Filmen der aliphatischen Polyester, PCL und SP 4/6 untersucht (Abb. 5-29; Abb. 5-30). Sowohl bei den Filmen als auch bei den

Nanopartikeln der aliphatischen Polyester wurde ein Abbau mit der dP(3HB)-Depolymerase Phaz5 gemessen, wobei der Abbau der Nanopartikel deutlich schneller verlief.

Der Abbau der aliphatischen Nanopartikel SP 4/6 und PCL war bei gleicher Enzymkonzentration signifikant langsamer als der Abbau der dP(3HB)-Nanopartikel. Der Abbau der PCL-Nanopartikel erfolgte über einen Zeitraum von 3 h bis zu einer Gesamtesterspaltungshöhe von nur etwa 20 % (Abb. 5-29), was unter Umständen auf eine Hydrophilisierung der Oberfläche durch sowohl freiwerdende Hydroxyl- und Carboxylgruppen als auch kurze an der Oberfläche adsorbierte Polyesterketten zurückzuführen ist, die eine weitere Bindung der PhaZ5 verhinderte. Anders verlief der Abbau der SP 4/6-Nanopartikel. Innerhalb von 2 h wurden hier ca. 20 % der verfügbaren Gesamtestergruppen gespalten. Anschließend folgte eine langsamere Hydrolyse, in welcher nach ca. 18 h eine Gesamtsterspaltungshöhe von 50 % erreicht wurde (Abb. 5-29). Zu diesem Zeitpunkt waren keine Partikel im Reaktionsgefäß mehr sichtbar, d.h. die Polyesterketten sollten in wasserlösliche Bestandteile übergegangen sein.

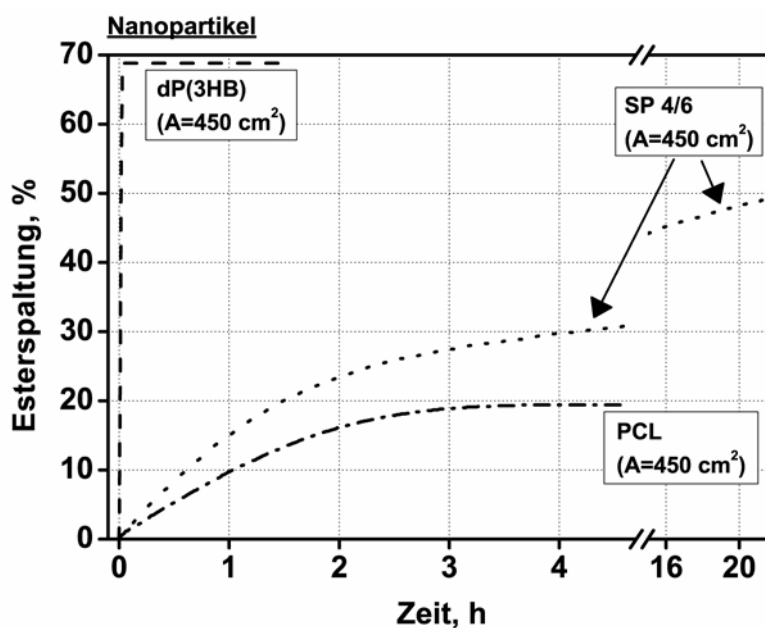


Abb. 5-29: Abbau von dP(3HB)-, SP 4/6- und PCL-Nanopartikel mit PhaZ5 in milliQ-H₂O bei 37 °C und pH 8. Die PhaZ5-Proteinkonzentration betrug 0,83 µg mL⁻¹. Die verwendeten Polyester waren dP(3HB) (0,85 mg, Ø 95 nm), SP 4/6 (1,45 mg, Ø 151 nm) und PCL (1,45 mg, Ø 150 nm).

Unter der Annahme, dass PhaZ5 analog zu anderen dP(3HB)-Depolymerasen nicht an amorphen Regionen adsorbiert, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass auch innerhalb der amorphen Nanopartikel der aliphatischen Polyester kleinere Kristallite vorhanden sind, an die die PhaZ5 adsorbieren konnte. So kann auch durch die von Herzog et al. [2006] durchgeführten Messungen zur Temperaturabhängigkeit nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass geringe kristalline Bereiche innerhalb der Nanopartikel vorhanden sind.

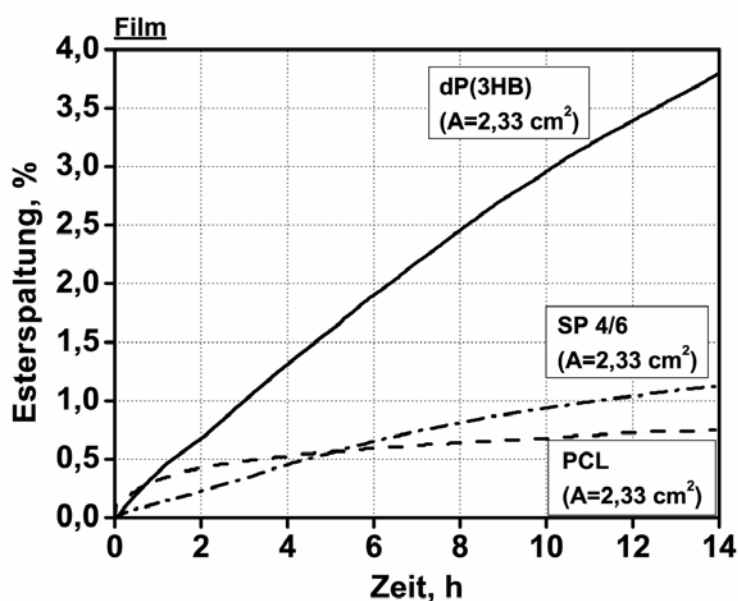


Abb. 5-30: Abbau von dP(3HB)-, SP 4/6- und PCL-Filmen (1 Film, Ø 12 mm, 170 µm dick) in milliQ-H₂O mit PhaZ5 bei 37 °C und pH 8. Die PhaZ5-Proteinkonzentration betrug 0,83 µg mL⁻¹.

Die gemessenen Abbaugeschwindigkeiten der semikristallinen Filme unterschieden sich nicht so sehr wie die der Nanopartikel. Zu Beginn erfolgte der Abbau des PCL-Films mit einer zum dP(3HB)-Film vergleichbaren Rate, flachte jedoch nach 1 h signifikant ab und erfolgte danach nur noch sehr langsam. Nach 14 h Inkubation waren ca. 0,75 % der Estergruppen im PCL-Film gespalten. Der Verlauf der Abbaukurve kann vermutlich auf mögliche kurze Polyesterkettenbereiche mit höherer Flexibilität zu Beginn des Abbaus zurückgeführt werden. Beim Abbau des SP 4/6-Films wurde ein kontinuierlich langsamer leicht abflachender Abbau bis zu einer Gesamtesterspaltungshöhe von ca. 1 % beobachtet. Ein vergleichbares Bild ergab sich bei dem dP(3HB)-Film, wobei hier nach 14 h Abbau eine Gesamtsterspaltungshöhe von 4 % erreicht wurde.

Für den Film-Abbau würde man aufgrund der relativ konstant bleibenden Oberfläche auch einen linearen Verlauf der Abbaukurve erwarten. Jedoch nahm unabhängig vom Polyester der Abbau im Laufe der Inkubationszeit ab. Zum einen könnte hier eine gewisse Enzyminaktivierung vorliegen, die sich aufgrund der vorliegenden Daten allerdings nicht belegen lässt. Des Weiteren könnte der beobachtete Verlauf zunächst auf der vornehmlichen Hydrolyse amorpher Bereiche in dem semikristallinen Polymer beruhen und so zu einer Anreicherung kristalliner Regionen („Verkrustung“) an der Oberfläche führen, die dann langsamer hydrolysiert werden.

Der geringere Abbau der aliphatischen Polyesterfilme SP 4/6 und PCL ist unter Umständen auch auf den bereits erwähnten Weichmachereffekt der d(P3HB)-Depolymerasen zurückzuführen, welcher durch eine spezifische Interaktion der SBD mit der dP(3HB)-Oberfläche hervorgerufen wird (Kap. 3.4). Ähnlich zum „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ bei der Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes kommt es vermutlich nur zur vollständigen Entfaltung des Weichmachereffektes, wenn die Substratbindedomäne molekülspezifisch mit dem d(P3HB) interagiert. Bei SP 4/6 und PCL liegen chemische Strukturen vor, die eine spezifische Adsorption nicht ermöglichen. Demnach adsorbiert die d(P3HB)-Depolymerase PhaZ5 an der Oberfläche wahrscheinlich unspezifisch, und dementsprechend kommt der Weichmachereffekt hier nicht zu Tragen. Folglich wäre die hydrolytische Reaktion aufgrund verminderter Kettenmobilität eingeschränkt. Allerdings sollten gemäß dieser Theorie der Abbau der SP 4/6- und PCL-Nanopartikel eine zu den d(P3HB)-Nanopartikeln vergleichbare Hydrolyserate aufweisen, da sich hier die Polyesterketten in einem Zustand erhöhter Flexibilität befinden und so der Weichmachereffekt keine Rolle spielen sollte. Dies ist aber nicht der Fall. Daher sind noch weitere Faktoren für die geringe Aktivität gegenüber SP 4/6 und PCL verantwortlich. Die hohe Spezifität des katalytischen Zentrums könnte einen solchen Faktor darstellen.

Der Abbau von PCL und SP 4/6-Filmen mit einer dP(3HB)-Depolymerase, wie er in dieser Arbeit beobachtet wurde, wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Jaeger et al. [1995] und Kasuya et al. [1999] führten zwar Abbautests mit PhaZ5 und anderen dP(3HB)-Depolymerasen an synthetischen Polyestern durch, hierbei wurde allerdings keine Erosion der Polymere beobachtet. Ein enzymatischer Angriff durch dP(3HB)-Depolymerasen wurde bisher nur gegenüber SP 2/4, SP 2/6 sowie Bionollen, einem auf SP 4/4 basierenden kommerziellen aliphatischen Polyester, festgestellt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass bei den Versuchen von Jaeger et al. [1995] und Kasuya et al. [1999] die Aktivität über Gewichtsabnahme der Polymerfilme bzw. über die Abnahme der Trübung einer

Polymerdispersion erfasst wurde während bei den hier durchgeführten Experimenten der Abbau über die Bildung freier Säuren während der Hydrolyse verfolgt wurde, was wesentlich sensitiver ist als z.B. Messungen des Gewichtsverlustes. Die Verwendung unterschiedlicher Testsysteme könnte daher die Ursache der divergenten Ergebnisse sein.

5.2.5.1 Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Enzymaktivität der PhaZ5

Im Vorfeld der Experimente zum Abbau von dP(3HB)-Granula mit der dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 wurden drastische Aktivitätsunterschiede festgestellt, wenn die Messungen einmal in milliQ-H₂O oder in 0,9 %-NaCl-Lösung durchgeführt wurden (Abb. 5-31). Die Erhöhung der Salzkonzentration auf umgerechnet 154 mM NaCl in der Messlösung führte zu einer deutlichen Verringerung der Abbaugeschwindigkeit der PhaZ5. Um einen genaueren Einblick auf den Einfluss der Salzkonzentration auf die Aktivität der PhaZ5 zu gewinnen, wurden die im Folgenden beschriebenen systematischen Abbauntersuchungen bei variierender Salzkonzentration und Enzymkonzentration durchgeführt. Zusätzlich wurden auch Versuche mit SP 4/6-Nanopartikeln durchgeführt, die einen Einblick in den Adsorptionsmechanismus geben sollten.

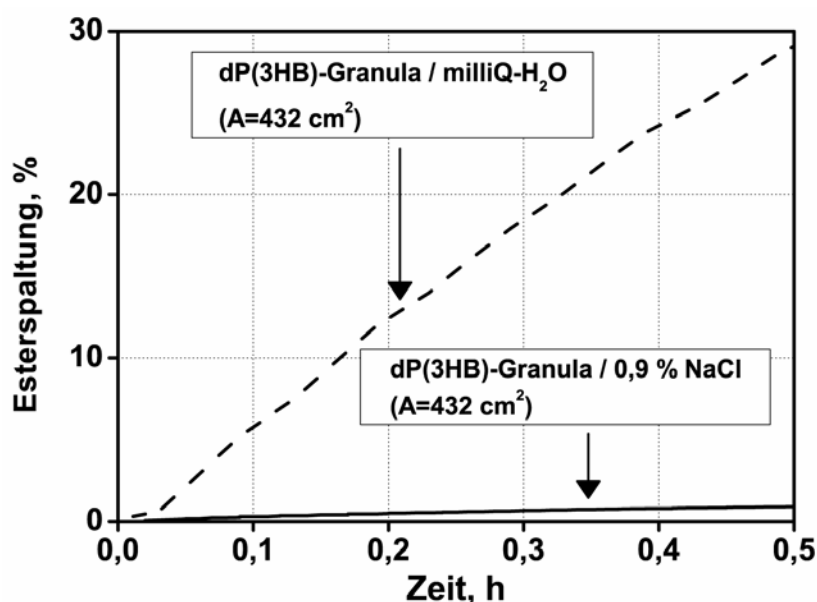


Abb. 5-31: Abbau von 12 mg dP(3HB)-Granula (\varnothing 1,39 μm) in milliQ-H₂O und 0,9 % NaCl-Lösung bei 37 °C, pH 8 und einer Proteinkonzentration von 0,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

In Abb. 5-32 ist der Abbau von dP(3HB)-Granula in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration an PhaZ5 aufgetragen. Analog zu den Untersuchungsergebnissen von Mukai et al. [1993b] und Timmins et al. [1997], die auch Hydrolyseraten von dP(3HB) bei variierenden Enzymkonzentrationen betrachteten, trat mit zunehmender Enzymkonzentration eine Inhibierung auf. In milliQ-H₂O wurde bei einer PhaZ5-Enzymkonzentration von 0,5 µg mL⁻¹ die höchste Abbaurate ($r_{\max}=0,2576 \mu\text{mol min}^{-1}$) bestimmt. Damit wurde r_{\max} deutlich unterhalb der maximalen Enzymbelegung erreicht, die basierend auf der Methode nach Tonford (vgl. Anhang, $M_{w/\text{PhaZ5}}=50 \text{ kDa}$, $A=36 \text{ cm}^2$) mit 1,8 µg mL⁻¹ abgeschätzt werden kann. Nach Überschreiten von r_{\max} wurden bis zu einer Enzymkonzentration von 1,5 µg mL⁻¹ hohe Aktivitätseinbußen verzeichnet. Die Aktivität nahm in diesem Bereich um etwa 40 % ab. Anschließend sank die Abbaurate langsamer und erreichte bei einer Enzymkonzentration von 3,3 µg mL⁻¹ einen Wert von 0,0986 µmol min⁻¹.

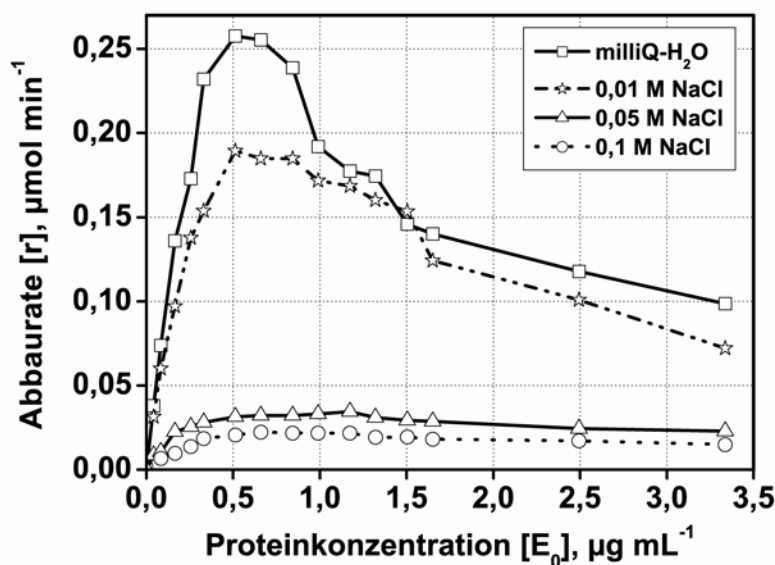


Abb. 5-32: Abbau von 1 mg dP(3HB)-Granula ($\varnothing 1,39 \mu\text{m}$) mit einer Gesamtoberfläche von 36 cm^2 in Abhängigkeit von der eingesetzten Gesamtenzymkonzentration und der NaCl-Konzentration. Die Messungen wurden bei pH 8,0 und 37 °C durchgeführt.

Im Vergleich dazu verbreiterten sich die Optima mit zunehmender Ionenstärke hin zu größeren Enzymkonzentrationen und die Abbaurate nahm nach Überschreiten von r_{\max} weniger schnell ab. Dieses Verhalten wird besonders nach der Normierung der Daten in Bezug auf r_{\max} deutlich (Abb. 5-33). Zudem zeigte sich, dass die normierten Abbauraten vor Erreichen von r_{\max} unabhängig von der NaCl-Konzentration nahezu auf einer Geraden liegen.

Als Grund für die Inhibierung bei zunehmender Enzymkonzentration wird der modulare Aufbau der dP(3HB)-Depolymerasen, welcher basierend auf Alignment-Studien auch für die PhaZ5 zutrifft, angegeben (Kap. 3.4 und [Mukai et al. 1993b, Kasuya et al. 1999]). Die Linkerdomäne, die Substratbindedomäne und die katalytische Domäne miteinander verbindet, wird mit ansteigender Enzymbelegung unwirksam. Als Folge dessen erreicht die katalytische Domäne nicht mehr die Polymeroberfläche und der Enzym-Substrat-Komplex kann nicht mehr ausgebildet werden. In Übereinstimmung zu diesem Modell treten auch bei den hier vorgestellten Untersuchungen mit PhaZ5 die Inhibierungen bereits deutlich unterhalb der maximalen Belegung auf.

Die Höhe der NaCl-Konzentration in der Reaktionslösung übte einen hohen Einfluss auf die PhaZ5-Aktivität aus und führte mit ansteigender Ionenstärke zu drastischen Aktivitätseinbußen. Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration von 0 auf 0,01 M führte im Maximum zu einem Aktivitätsverlust von 25 %. Bei einer NaCl-Konzentration von 0,05 M und 0,1 M waren sogar nur noch 10 % der Aktivität im Vergleich zu der in milliQ-H₂O zu beobachten.

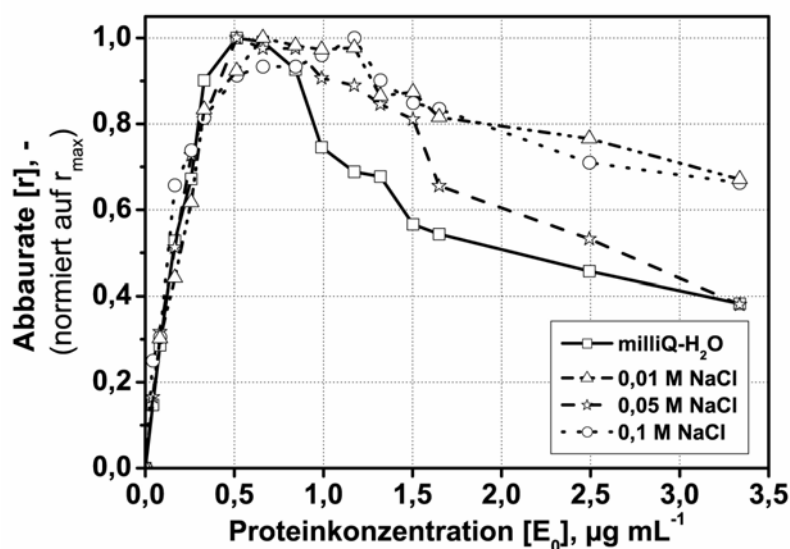


Abb. 5-33: Normierter Abbau der dP(3HB)-Granula (1mg, Ø 1,39 µm, 36 cm²) in Abhängigkeit von der eingesetzten PhaZ5-Gesamtenzymkonzentration und der NaCl-Konzentration. Die Messungen wurden bei pH 8,0 und 37 °C durchgeführt.

Aufgrund des modularen Aufbaus der PhaZ5 kann sich eine Erhöhung der NaCl-Konzentration unterschiedlich auf die einzelnen Domänen auswirken und so verschiedene Effekte hervorrufen. Die Funktion der Linkerdomäne die katalytische Domäne an die

Polymeroberfläche heranzuführen, könnte gegebenenfalls unter dem Einfluss ansteigender Salzkonzentrationen eingeschränkt sein und die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes verhindern. Ähnliches würden auch konformative Änderungen in der Struktur der katalytischen Domäne bewirken. Als Folge dessen würde eine Abnahme Abbaugeschwindigkeiten zu beobachten sein. Jedoch erklärt dies nicht das Maximumverhalten. Ein weiterer möglicher Faktor könnte sich aus einer veränderten Adsorptionsneigung der SBD ergeben. Eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Adsorptionsneigung würde zu einer Verschiebung von r_{\max} hin zu geringeren bzw. höheren Enzymkonzentrationen führen. Bei den hier beschriebenen Untersuchungen wurde zwar keine Verschiebung der Optima sehr wohl aber eine Verbreiterung beobachtet. Möglicherweise beeinflusst die NaCl-Konzentration in der Lösung das Adsorptionsverhalten der PhaZ, was sich aber auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig beweisen lässt.

Des Weiteren könnten unterschiedliche NaCl-Konzentrationen Einfluss auf den bereits erwähnten „Weichmachereffekt“ zwischen der Substratbindedomäne (SBD) und der hydrophoben dP(3HB)-Oberfläche ausüben (Kap. 3.4). So wurde beschrieben, dass die SBD vermutlich molekülspezifisch sowohl über elektrostatische als auch über hydrophobe Wechselwirkungen auf der dP(3HB)-Oberfläche adsorbiert [Fujita et al. 2005, Kasuya et al. 1999, Hiraishi et al. 2006]. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Daten könnte durchaus die Salzkonzentration in der Lösung Einfluss auf diese Wechselwirkungen ausüben. Als Folge dessen könnte die Intensität des Weichmachereffektes abnehmen, und die sich anschließende katalytische Reaktion vermindert werden. So wird beispielsweise NaCl in der Affinitätschromatographie zur Herabsetzung der elektrostatischen Wechselwirkungen oder in der hydrophoben Interaktionschromatographie zur Erhöhung der hydrophoben Wechselwirkungen eingesetzt. Allerdings bewirken erst hohe NaCl-Konzentrationen ab etwa 3 M eine signifikante Erhöhung der hydrophoben Wechselwirkungen („Aussalzen“ von Proteinen). Daher müsste der NaCl-Effekt wohl auf veränderte elektrostatische Wechselwirkungen zwischen SBD und dP(3HB)-Oberfläche zurückgeführt werden, was in Folge zu einer Schwächung des Weichmachereffektes (geringere Kettenmobilität auf der Oberfläche) führt. Ähnliches beobachtete auch Kasuya et al. [1995] bei Messungen mit der dP(3HB)-Depolymerase aus *Alcaligenes faecalis* T1 (PhaZ_{Afa}) in Phosphatpuffer (0,1 bis 1 M). Hier nahm analog zu den Experimenten mit der PhaZ5 r_{\max} mit zunehmender Salzkonzentration ab. Dies stützt die Vermutung, dass mit zunehmender Salzkonzentration die Effektivität des Weichmachereffektes möglicherweise vermindert wird.

5.2.5.2 Enzymatische Hydrolyse von synthetisch aliphatischen Nanopartikeln

Im vorangegangenen Abschnitt wurde mit der dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 erstmals ein messbarer Abbau gegenüber den synthetisch aliphatischen Polyestern SP 4/6 und PCL (Abb. 5-29, Abb. 5-30) nachgewiesen. Allerdings sind die Abbauraten gegenüber den synthetischen Polyestern signifikant geringer als gegenüber dem natürlichen Polyester dP(3HB). Im folgenden Abschnitt sollte nun in systematischen Untersuchungen der Abbaumechanismus der dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 an synthetischen Polyestern näher beleuchtet werden. Dazu wurden Messungen mit SP 4/6-Nanopartikeln bei 37 °C und pH 8 in milliQ-H₂O durchgeführt. Dabei blieb die Gesamtoberfläche der SP 4/6 Nanopartikel mit 36 cm² identisch zu den in Kap. 5.2.5.1 beschriebenen Versuchen an dP(3HB)-Granula. Systematische vergleichende Untersuchungen zwischen dP(3HB)-Nanopartikeln und SP 4/6-Nanopartikeln waren nicht möglich, da der Abbau der dP(3HB)-Nanopartikel mit PhaZ5 zu schnell erfolgte, um ihn mit der hier verwendeten Messmethodik genau zu erfassen. Im Falle der SP 4/6 Nanopartikel war es nicht möglich, den Einfluss der Ionenstärke zu überprüfen, da die Zugabe von Salzionen zu einem Ausflocken der Polyester-Nanopartikel und somit zu einer Veränderung der Gesamtoberfläche führt [Welzel 2003].

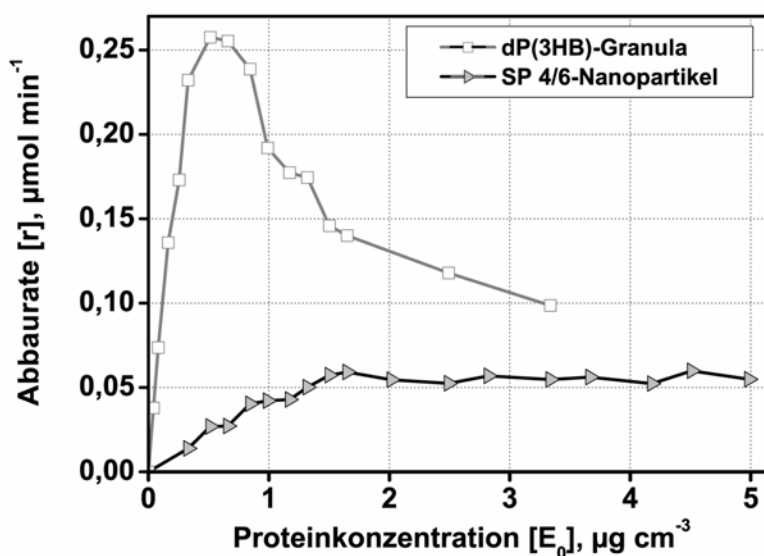


Abb. 5-34: Abbau von SP 4/6 Nanopartikeln (0,12 mg, Ø 151 nm, 36 cm²) und 1 mg dP(3HB)-Granula (Ø 1,39 μm) mit PhaZ5 bei 37 °C. Die Messungen wurden bei 37 °C, pH 8 und in milliQ-H₂O durchgeführt.

In Abb. 5-34 ist der Verlauf der anfänglichen Abbauraten in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration dargestellt. Die Abbauraten waren gegenüber SP 4/6-Nanopartikeln signifikant niedriger als gegenüber den dP(3HB)-Granula. Der Verlauf der Kurve unterschied sich deutlich von dem für die dP(3HB)-Granula. Im Gegensatz zum Abbau des dP(3HB)s war für den Angriff der PhaZ5 auf dem synthetischen Polyester SP 4/6 in milliQ-H₂O kein Absinken der Abbaurate ab einer bestimmten Enzymkonzentration zu beobachten. Eine Normierung der Daten gegenüber der Maximalaktivität verdeutlicht dieses Bild (Anhang Abb. 7-2). Beim Abbau der SP4/6-Nanopartikel wurde im Vergleich zu den dP(3HB)-Granula die maximale Aktivität r_{\max} deutlich später erreicht ($1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ bei SP 4/6 $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ bei dP(3HB)-Granula), was unter der Annahme einer vollständigen Adsorption der PhaZ5 einer Enzymebelegung von etwa $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ entspricht. Nach Tonford [1961] kann für PhaZ5 eine maximale Enzymebelegung von $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ abgeschätzt werden. Dies stimmt somit relativ gut mit dem experimentell ermittelten Wert überein.

Die Abbaumessungen deuten darauf hin, dass der Adsorptionsmechanismus auf der SP 4/6-Oberfläche sich signifikant von dem auf der dP(3HB)-Oberfläche unterscheidet. Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten der dP(3HB)-Depolymerasen zeigen, dass die SBD wohl molekülspezifisch über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen mit Methylgruppen und Carbonylgruppen des dP(3HB)-Moleküls interagiert (Kap. 3.4). Bezüglich des SP 4/6-Moleküls ist wahrscheinlich aufgrund der chemischen Struktur des Moleküls diese molekülspezifische Interaktion nicht möglich und eine Adsorption an die hydrophobe Polymeroberfläche erfolgt unter Umständen analog zur Adsorption von Lipasen über unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen. Möglicherweise ist die SBD sogar unwirksam und die Adsorption wird über hydrophobe Aminosäuren in der Umgebung des aktiven Zentrums bewerkstelligt. Dies würde dann auch das fehlende Maximumverhalten erklären, da in diesem Fall SBD und Linkerdomäne im Enzymmechanismus der dP(3HB)-Depolymerase nur noch eine untergeordnete Rolle spielen würden.

Obwohl die SP 4/6-Nanopartikel aufgrund ihrer Dimensionen weitgehend amorph sind [Herzog et al. 2006] sind die Abbauraten im Vergleich zu den semikristallinen dP(3HB)-Granula signifikant geringer (Abb. 5-34). Hierbei kann der fehlende Weichmachereffekt durch die spezifische Adsorption mit der SDB nicht als Begründung für dieses Verhalten herangezogen werden, da SP4/6 Nanopartikel weitgehend amorph vorliegen [Herzog et al. 2006] und somit schon eine hohe Kettenmobilität vorhanden ist. Somit muß geschlussfolgert werden, dass der niedrige Abbau der SP 4/6-Nanopartikel auf die spezifisch für dP(3HB)-Moleküle ausgerichtete Konformation des aktiven Zentrums der PhaZ5 zurückzuführen ist.

5.2.6 Enzymatische Hydrolyse von dP(3HB)-Nanopartikeln mit Lipasen

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt das Abbauverhalten einer dP(3HB)-Depolymerase gegenüber dem synthetischen Polyester SP 4/6 charakterisiert wurde, stellt sich nun die Frage, wie sich umgekehrt das Abbauverhalten von Lipasen, gegenüber verschiedenen synthetischen Polyestern im Vergleich zu natürlichen dP(3HB) darstellt.

Der enzymatische Abbau von Polyhydroxyalkanoat-Filmen mit relativ niedrigen Schmelzpunkten (T_m von 54 °C bis 70 °C) wurde bereits für mehrere Lipasen beschrieben [Mukai et al. 1993a, Jaeger et al. 1995]. Allerdings konnte bisher keine katalytische Aktivität von Lipasen gegenüber den hochschmelzenden dP(3HB)-Filmen nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich auf den hohen Schmelzpunkt von $T_m=180^\circ\text{C}$ zurückzuführen, der die Mobilität der Ketten und damit deren enzymatische Angreifbarkeit reduziert [Marten et al. 2003].

Da es sich andeutet, dass dP(3HB)-Nanopartikel bei kleinen Dimensionen weitgehend amorph vorliegen (Kap. 5.2.5), wurde zunächst untersucht, wie sich Lipasen gegenüber solchen amorphen dP(3HB)-Nanopartikeln verhalten. Welzel konnte kürzlich zeigen, dass Lipasen aus *Pseudomonas sp.* (PsL) und *Candida cylindracea* (CcL) in der Lage sind, dP(3HB) in Form von Nanopartikeln zu hydrolysieren [Welzel 2003]. In Abb. 5-35 sind die Ergebnisse der Untersuchungen verschiedener Lipasen und der dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 dargestellt. Die Abbautests wurden bei 37 °C und pH 7 (pH 8 bei PhaZ5) in milliQ-H₂O durchgeführt.

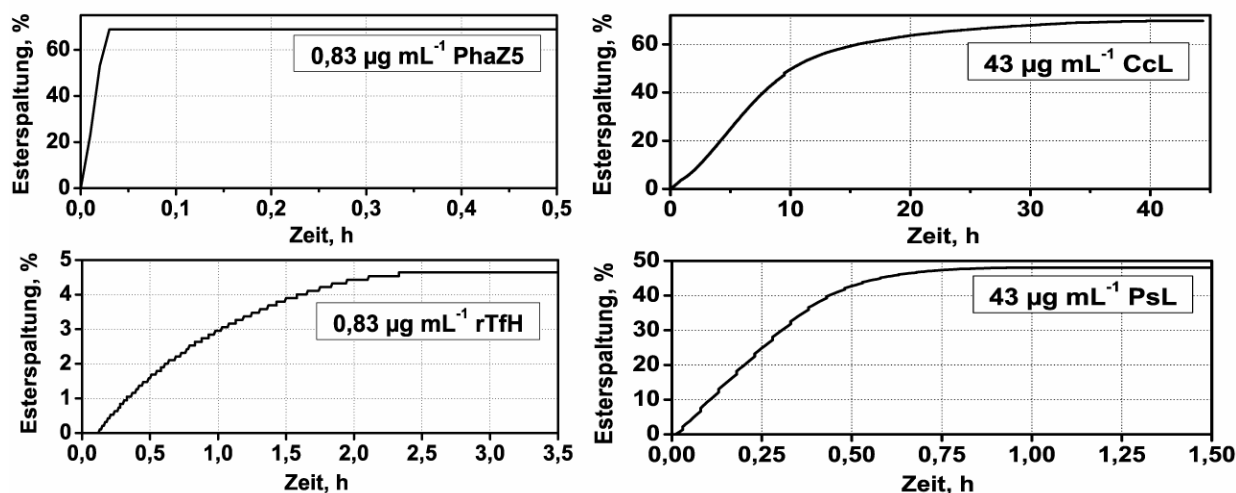


Abb. 5-35: Abbau von dP(3HB)-Nanopartikeln (0,85 mg, \varnothing 95 nm) mit Hydrolasen in Gegenwart von milliQ-H₂O bei 37 °C. Im Falle der rTfH, CcL und PsL wurden die Messungen bei pH 7 und für PhaZ5 bei pH 8 durchgeführt.

Im Falle der PsL und der CcL wurde unter oberflächenkontrollierenden Bedingungen gearbeitet ($A=450 \text{ cm}^2$, $E_0=43 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), während die Messungen mit PhaZ5 und rTfH unter enzymkontrollierenden Bedingungen ($A=450 \text{ cm}^2$, $E_0=0,83 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) durchgeführt wurden. Für die PhaZ5 sollte so eine Inhibition vermieden werden. Die Enzymkonzentration der rTfH wurde in diesem Experiment so gering gewählt, damit ein direkter Vergleich zwischen rTfH und PhaZ5 möglich war. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationsbedingungen sind daher nur semiquantitative vergleichende Aussagen zu den Abbauraten möglich.

In Übereinstimmung mit den Messungen von Welzel [Welzel 2000] waren sowohl PsL als auch CcL in der Lage dP(3HB)-Nanopartikel mit einer signifikanten Geschwindigkeit zu hydrolysieren, wobei eine deutlich höhere Abbaurrate für PsL im Vergleich zur CcL gemessen wurde (Abbaurrate der PsL: $0,2879 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$, Abbaurrate der CcL: $0,0096 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$). Im Vergleich zur Hydrolyse der dP(3HB)-Nanopartikel mit PhaZ5 (Abbaurrate der PhaZ5: $11,8 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$) erfolgte der Abbau mit Lipasen um 2 bis 4 Zehnerpotenzen langsamer. Unter der Berücksichtigung der im Vergleich zur CcL und PsL deutlich geringeren verwendeten PhaZ5 Enzymkonzentration, ist dieser Aktivitätsunterschied wahrscheinlich noch höher. Unerwartet war die sehr geringe Abbaugeschwindigkeit von rTfH (Abbaurrate der rTfH: $0,006 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$). Dieses Enzym zeigte beim Abbau von aliphatischen Polyestern meist höhere Aktivitäten als PsL (Abb. 5-22) und wies gegenüber aromatischen Polyestern (Abb. 5-26) und aliphatisch-aromatischen Copolyestern (Abb. 5-22) außergewöhnlich hohe Abbauleistungen auf. Die vergleichsweise niedrigere Abbaugeschwindigkeit kann auch nicht auf die geringe Enzymkonzentration zurückgeführt werden, die bei der rTfH eingesetzt wurde. In Abb. 5-36 ist die Abbaugeschwindigkeit von dP(3HB)-Nanopartikeln mit rTfH in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration aufgetragen. Eine Erhöhung der Enzymkonzentration (zuge setzte Enzymkonzentration ca. $12 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) führte zu keiner weiteren signifikanten Steigerung der Abbaugeschwindigkeit.

Der Eintritt des Plateaus stimmt unter der Annahme, dass das zugesetzte Enzym weitestgehend auf der Polymeroberfläche adsorbiert wurde mit der nach Tonford (vgl. Anhang) berechneten maximalen Belegung überein, die für die rTfH ($M_{w/rTfH}: 31 \text{ kDa}$) mit $0,3 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$ abgeschätzt werden kann. Hinsichtlich der dP(3HB)-Nanopartikel wurde mit rTfH eine maximale Enzymbelegung bei $0,45 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$ (Oberfläche der dP(3HB)-Nanopartikel: 152 cm^2) erreicht. Demnach lag die Abbaugeschwindigkeit der rTfH auch unter oberflächenkontrollierenden Bedingungen deutlich unter der Abbaugeschwindigkeit, die mit PsL erreicht wurde (Abb. 5-36).

Da bei den weitgehend amorphen dP(3HB)-Nanopartikeln die Mobilität der Polyesterketten keinen begrenzenden Faktor darstellen sollte, sind die beobachteten Unterschiede in den Enzymaktivitäten hier wohl auf die sterische Kompatibilität zwischen dem aktiven Zentrum der Enzyme und den Substraten (chemische Umgebung der Estergruppen) zurückzuführen, die letztendlich die katalytische Effektivität der Enzyme bestimmen. So wurde in der Literatur bereits über den Einfluss von Seitengruppen bei aliphatischen Polyestern berichtet. In den Abbauprobungen mit Polyhydroxyalkanoaten wiesen verschiedene Lipasen nur eine Aktivität gegenüber dem unverzweigten Polymer auf [Jaeger et al. 1995]. Demnach scheint das Vorhandensein einer Seitenkette in der Nähe der zu spaltenden Estergruppe besonders bei der rTfH bei der Ausrichtung der Estergruppe zur katalytischen Triade hinderlich zu sein.

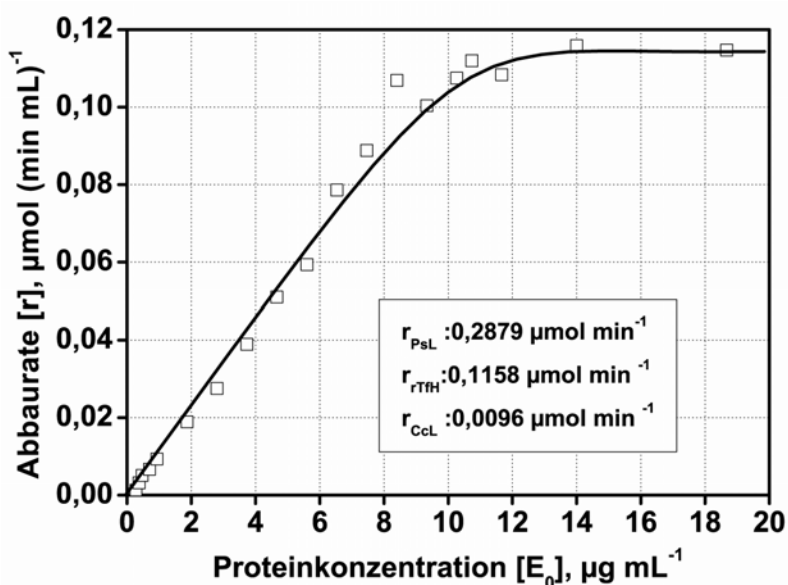


Abb. 5-36: Abbau von 0,31 mg dP(3HB)-Nanopartikeln (\varnothing 95 nm, $A=152 \text{ cm}^2$) mit rTfH in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bei 37 °C und pH 7 in Gegenwart von milliQ-H₂O.

Auffällig ist in Abb. 5-35, dass die erreichten maximalen Anteile an gespaltenen Estergruppen für dP(3HB) bei der rTfH deutlich unter denen der anderen verwendeten Hydrolasen lag. rTfH hydrolysierte nur etwa 5 % der verfügbaren Estergruppen im Polymer. Bei PsL, CcL und PhaZ5 hingegen lagen die maximalen Anteile an gespaltenen Estergruppen zwischen 50 % und 70 %. Zudem waren hier nach Beendigung der Messung keine Nanopartikel im Reaktionsgefäß zu erkennen. Folglich lagen die verbliebenen Estergruppen offenbar in wasserlöslichen dP(3HB)-Intermediaten vor. Üblicherweise wurde bei der rTfH bisher ein Umsatz von nahezu 100 % der zu spaltenden Estergruppen im Polyester erreicht (Kap. 5.2.3.2

und [Kleeberg et al. 2005]). Dieses Hydrolyseverhalten konnte auf die fehlende Grenzflächenaktivierung der rTfH zurückgeführt werden (Kap. 5.2.2.3), die neben der Lipaseaktivität auch eine signifikante Esteraseaktivität bei diesem Enzym bedingt. Die niedrige könnte auf die geringe rTfH-Proteinkonzentration ($E_0 = 0,83 \mu\text{g mL}^{-1}$) zurückzuführen sein. Jedoch ist aus Abb. 5-37 zu entnehmen, dass eine weitere Erhöhung der rTfH-Proteinkonzentration zu keiner signifikanten Erhöhung der Esterspaltungen führte. Auch nach Erreichen der vollständigen Enzymbelegung (gepunktete Linie) blieben die Anteile der maximal hydrolysierten Estergruppen vergleichsweise gering. Da die dP(3HB)-Nanopartikel weitgehend amorph sind lassen sich die geringen Esterspaltungshöhen nur in Zusammenhang mit einer irreversiblen Blockierung des aktiven Zentrums der rTfH durch dP(3HB)-Intermediate diskutieren. Vorstellbar wäre, dass die im Verlauf des Abbaus generierten dP(3HB)-Intermediate sich von der Nanopartikeloberfläche ablösen und in Lösung zwar mit rTfH einen Enzym-Substrat-Komplex ausbilden, dieser aber aufgrund veränderter sterischer Verhältnisse zu einer irreversiblen Blockierung des aktiven Zentrums führt.

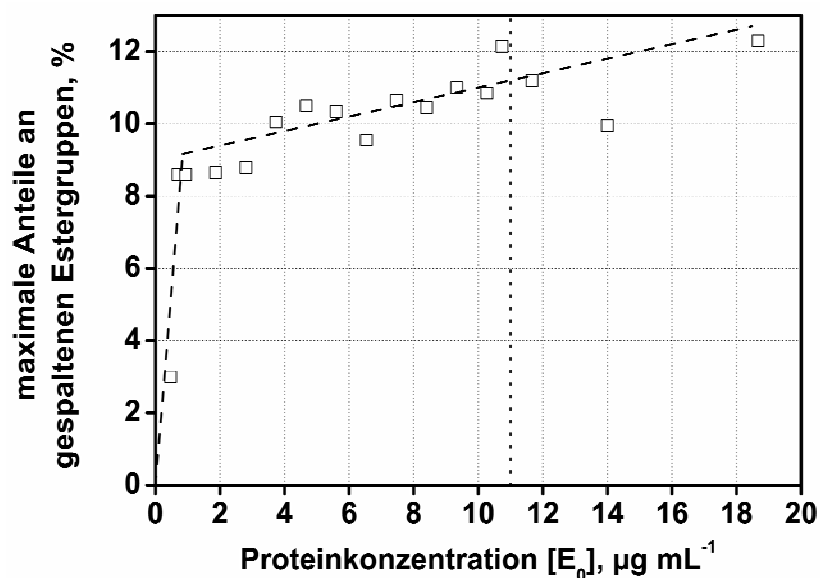


Abb. 5-37: Maximale Anteile an gespaltenen Estergruppen beim Abbau von dP(3HB)-Nanopartikeln (0,31 mg, \varnothing 95 nm) durch rTfH in milliQ- H_2O bei 37 °C und pH 7. Die gepunktete Linie markiert den Übergang von Substratüberschuss in Enzymüberschuss.

5.2.7 Zusammenfassende Darstellung der vergleichenden Untersuchungen zum Abbaumechanismus an Polyestern

Das Ziel der in diesem Abschnitt geschilderten Versuche war es, durch systematische vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Hydrolasen (rTfH, PsL, PhaZ5) neue Erkenntnisse zum Mechanismus der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von Estergruppen an festen wasserunlöslichen Kunststoffoberflächen zu gewinnen. Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag dabei auf der rekombinant produzierten rTfH, die aufgrund ihres besonders hohen Abbaupotentials gegenüber Polyestern mit aromatischen Strukturelementen eingehender charakterisiert werden sollte. In Tab. 5-9 sind wesentliche Charakteristika der drei Hydrolasen nochmals zusammenfassend dargestellt. Um das Bild zu vervollständigen, sind Enzymcharakteristika für die dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 aus *Paucimonas lemoignei* aus verschiedenen Literaturstellen aufgeführt. Aufgrund der hohen Substratspezifität der PhaZ5 wurde diese hauptsächlich nur für systematische Untersuchungen mit dP(3HB) benutzt.

Im Vergleich zu anderen lipolytischen Enzymen (BRENDA-Datenbank) weisen PsL und rTfH mit ca. 30 kDa ein vergleichbares Molekulargewicht auf. PhaZ5 ist mit einem Molekulargewicht von 50 kDa ebenfalls vergleichbar mit anderen dP(3HB)-Depolymerasen [Jendrossek und Handrick 2002]. Die pH-Optima aller untersuchten Hydrolasen liegen im neutrophilen pH-Bereich und nehmen in der Reihenfolge PsL über rTfH und PhaZ5 hin zu (Tab. 5-9). Die betrachteten Hydrolasen zeigen im thermophilen Temperaturbereich maximale Enzymaktivität (Tab. 5-9 und Kap. 5.2.2.1). Die relativ hohen Temperaturoptima spiegeln sich allerdings nicht unbedingt in deren Temperaturstabilität wieder. Während rTfH, die bei 55 °C in 0,9 % NaCl-Lösung eine Halbwertszeit von 84 h zeigt, liegt die Halbwertszeit der PsL bei identischen Bedingungen unter 10 h. Für die PhaZ5 kann bei 50 °C (100 mM Phosphatpuffer, 1 mM CaCl₂, pH 8,0) eine Halbwertszeit abgeschätzt werden, die ebenfalls deutlich unterhalb von 10 h liegt [Braaz et al. 2002].

Tab. 5-9: Zusammenstellung von biochemischen Charakteristika und Abbaugeschwindigkeiten verschiedener Estersubstrate durch die Hydrolasen rTfH, PsL und PhaZ5.

	Hydrolase rTfH	Lipase PsL	dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5
Molekulargewicht, kDa	31	29	50
pI	6,7	5,7	7,6 ¹
pH Optimum	7	6,5	8 ¹
Temperaturoptimum, °C	55 ^a	60 ^a	55 ¹
Temperaturstabilität $t_{1/2}$, h			
30 °C	+++	++	n.b.
50 °C	n.b.	n.b.	+ ²
55 °C	++	+	n.b.
Grenzflächenaktivierung	nein	ja	n.b.
Abhängigkeit der Abbaurate von ΔT_{mt}	ja	ja	n.b.
Weichmachereffekt	nein	nein	ja
Adsorption an der festen Oberfläche	unspezifisch	unspezifisch	spezifisch bei dP(3HB) / unspezifisch bei synth. Polyestern
Einfluss der Ionenstärke auf Abbaurate	n.b.	n.b.	+++
Spaltung wasserlöslicher Polyester- spaltprodukte	+++ ^b	+	+
<u>Substrate:</u>			
Triolein / Tributyrin	++ / +++	++ / +++	- / - ³
wasserlösliche Estersubstrate	+++	+	+
aliphatische Polyester (SP n/n)	++	++	+ ^{3,4}
SP 4/6 (amorph)	+++	+++	+
SP 4/6 (teilkristallin)	++	++	+
SP 4/4 (teilkristallin)	+	-	n.b.
aliphatisch aromatische Copolyester	+++	++	n.b.
PET (amorph)	+++	++	n.b.
PET (teilkristallin)	++	-	n.b.
dP(3HB) (teilkristallin)	n.b.	n.b.	+++
dP(3HB) (amorph)	+	+	+++

¹Daten aus Jendrossek und Handrick [2002]; ²Daten aus Braaz et al. [2002]; ³Daten aus Jaeger et al. [1995]; ⁴Daten aus Kasuya et al. [1999]; ^aT_{opt}-Bestimmung erfolgte mit Triolein, ^bAusnahme: dP(3HB), ermittelte Esterspaltungshöhe liegt bei 3-12 % der vorhandenen Estergruppen im Probenkörper

n.b. = nicht bestimmt, - = keine Aktivität, + = geringe Aktivität, geringe Temperaturstabilität; ++ = hohe Aktivität, hohe Temperaturstabilität; +++ sehr hohe Aktivität, sehr hohe Temperaturstabilität

Die Ergebnisse zur Temperaturstabilität scheinen zunächst im Widerspruch zu den ermittelten Temperaturoptima zu stehen. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass sich hier zwei Prozesse überlagern, zum einen die thermodynamisch begründete Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit (vergleichbar zur chemischen Reaktion) und zum anderen der Prozess der irreversiblen thermischen Proteindenaturierung [Bisswanger 1979]. Demnach gibt das Temperaturoptimum nur indirekt den Bereich maximaler Enzymaktivität an, da in diesem Bereich bereits häufig eine signifikante Denaturierung des Enzyms zu beobachten ist. Dies würde für die hier untersuchten Hydrolasen zunächst bedeuten, dass vornehmlich rTfH für technische enzymatische Prozesse im thermophilen Bereich geeignet wäre, und PsL bzw. PhaZ5 nur deutlich unterhalb ihres Temperaturoptimums Anwendung finden könnten.

Die heterogene Katalyse von Estergruppen an wasserunlöslichen Kunststoffoberflächen umfasst zwei Schritte, die Adsorption des Enzyms an der festen Oberfläche und die enzymatische Katalyse der Estergruppen. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde der erste Schritt, das Adsorptionsverhalten von Hydrolasen, nur am Rande betrachtet. Aus der Literatur ist bekannt, dass Lipasen und dP(3HB)-Depolymerasen in der Regel als dicht gepackter Monolayer auf festen Oberflächen adsorbieren [Martinelle et al. 1995, Gitlesen et al. 1997, Kasuya et al. 1996, Yamashita et al. 2003]. Untersuchungen zum Einfluss des Belegungsgrades auf das katalytische Verhalten von Lipasen auf Kunststoffoberflächen basierend auf verschiedenen Literaturstellen [Herzog et al. 2006, Welzel 2000] und auf Untersuchungen mit der PsL und rTfH in dieser Arbeit (Abb. 5-23) zeigten, dass die Abbau-geschwindigkeit mit zunehmender Belegung linear zunimmt und nach Erreichen einer maximalen Belegung konstant bleibt. Eine Ausnahme von dieser Regel bilden die dP(3HB)-Depolymerasen, für die ab einem bestimmten Belegungsgrad, der deutlich unterhalb der vollständigen Enzymbelegung liegt, eine Abnahme der Abbaurate, also insgesamt eine Maximumskurve der Aktivität beobachtet wird. Das besondere katalytische Verhalten der dP(3HB)-Depolymerasen wird auf deren Domänenstruktur bestehend aus einer Substratbinde-domäne (SBD), einer flexiblen Linkerdomäne und einer katalytischen Domäne zurückgeführt, wodurch bei zunehmendem Belegungsgrad die Flexibilität der Linkerdomäne eingeschränkt wird und daher die katalytische Domäne nicht mehr nahe genug an die Polymeroberfläche reicht (Kap. 3.4). Analog zu anderen dP(3HB)-Depolymerasen wie beispielsweise der PhaZ_{Afa} aus *Alcaligenes faecalis* [Mukai et al. 1993b, Kasuya et al. 1995, Yamashita et al. 2003, Timmins et al. 1997] wurde in dieser Arbeit auch für PhaZ5 aus *Paucimonas lemoignei* dieses spezifische katalytische Verhalten bestätigt (Abb. 5-32). Jedoch zeigten auch Untersuchungen

zum Abbauverhalten der PhaZ5 mit SP 4/6-Nanopartikeln, dass dieses Verhalten nur beim Abbau von dP(3HB) auftritt. Der Abbau des synthetischen Polyesters SP 4/6 durch PhaZ5, der erstmals in dieser Form in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, wies mit zunehmender Enzymkonzentration einen zu Lipasen vergleichbaren Verlauf auf, d.h. selbst nach Erreichen der maximalen Belegung der Oberfläche trat keine Abnahme der Abbaugeschwindigkeit auf (Abb. 5-34). Auch beim Abbau von dP(3HB)-Nanopartikeln mit rTfH (Abb. 5-36) konnte keine Abnahme der Abbaugeschwindigkeit ab einer gewissen Enzymkonzentration beobachtet werden. Der Maximumsverlauf der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration ist also ausschließlich auf den Abbau des natürlichen Substrates dP(3HB) durch dP(3HB)-Depolymerasen beschränkt und ein Charakteristikum dieser Enzymklasse in Verbindung mit ihren natürlichen Substraten.

Marten et al. [2003, 2005] zeigte bereits anhand der Lipase PsL, dass der Abbau semikristalliner Polyester von der Temperaturdifferenz ΔT_{mt} zwischen der Polyesterschmelztemperatur und der Messtemperatur abhängig ist und einen entscheidenden Faktor für die Bioabbaubarkeit von Polyestern mit Lipasen darstellt (Kap. 3.7.2.3). Durch die Annäherung der Messtemperatur an den Polyesterschmelzpunkt wird die Mobilität der Polyesterketten im kristallinen Verbund erhöht. Dadurch können Polyesterketten temporär aus dem kristallinen Polymerverbund heraustreten und sich so besser in das aktive Zentrum der Enzyme einpassen. Im Verlauf dieser Arbeit wurde dieses Modell auch für die Hydrolase rTfH bestätigt (Kap. 5.2.3.1). Analog zur PsL nahm die Abbaugeschwindigkeit ab einer Temperaturdifferenz ΔT_{mt} von weniger als 30 °C signifikant zu. Demnach gehorcht der Polymerabbau mit rTfH wohl grundsätzlich vergleichbaren Mechanismen, wie es für PsL der Fall ist, und die Abbaugeschwindigkeit ist abhängig von der Kettenmobilität in den kristallinen Domänen.

Eine Ausnahme von dem Modell der Kettenmobilität bilden die dP(3HB)-Depolymerasen, bei denen sehr hohe Abbauraten bei einer Temperaturdifferenz weit über 30 °C ($\Delta T_{\text{mt}}=143^\circ\text{C}$ für dP(3HB)) beobachtet werden [Jaeger et al. 1995, Kasuya et al. 1996, Jendrossek und Handrick 2002, Doi 1990, Mukai et al. 1993a, Mukai et al. 1993b]. Am Beispiel der dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 aus *Paucimonas lemoignei* wurde in dieser Arbeit versucht, strukturelle und mechanistische Unterschiede, die offenbar zu dem abweichenden Abbauverhalten führen, zu identifizieren. Grundsätzlich kann anhand der Tatsache, dass dP(3HB)-Depolymerasen auch hochschmelzende Polyester hydrolysieren können, nicht

geschlossen werden, dass grundsätzlich keine Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit von ΔT_{mt} vorliegt. Hinweise darauf, dass die Kettenmobilität auch bei dP(3HB)-Depolymerasen Einfluss auf die Höhe der Abbaugeschwindigkeit ausübt, geben die Abbauraten der PhaZ5, gegenüber dP(3HB)-Nanopartikeln mit weitgehend amorpher Struktur und den semi-kristallinen dP(3HB)-Granula (Abb. 5-28). Hier lagen die Abbauraten gegenüber den Nanopartikeln um ein Vielfaches höher als gegenüber den Granula und zeigen deutlich, dass offenbar eine höhere Flexibilität der Polyesterkette letztendlich auch zu höheren Abbauraten führt.

Allerdings bleibt die Frage offen, inwiefern dP(3HB)-Depolymerasen im Gegensatz zu Lipasen die Hydrolyse der Estergruppen im hochschmelzenden dP(3HB) bewerkstelligen. Für die dP(3HB)-Depolymerasen wird eine spezifische Interaktion der Substratbindedomäne mit der dP(3HB)-Oberfläche durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen postuliert [Murase et al. 2002, Kikkawa et al. 2005, Fujita et al. 2005, Hisano et al. 2006]. Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen kann in Übereinstimmung zu unter anderem Hisano et al. [2006] vermutet werden, dass als Folge der spezifischen Interaktion es offenbar durch eine Art Weichmachereffekt der Substratbindedomäne zu einer Störung der intermolekularen Kräfte in der betreffenden Kristallregion und zu einer lokalen Erhöhung der Kettenmobilität auf der Polymeroberfläche kommt, die eine Hydrolyse der Estergruppen trotz des hohen Polyesterschmelzpunktes ermöglicht. Hinweise auf einen solchen Weichmachereffekt geben die durchgeführten Abbaumessungen mit dP(3HB)-Granula und PhaZ5 bei verschiedenen NaCl-Salzkonzentrationen. Hier wurde mit der Erhöhung der NaCl-Salzkonzentration eine deutliche Abnahme der Abbaurate bei gleicher Enzymkonzentration beobachtet (Abb. 5-32). Es ist bekannt, dass die Salzkonzentration in der Lösung die Wirksamkeit von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen beeinflusst. So könnte eine Erhöhung der Salzkonzentration auch Veränderungen des durch die spezifische Adsorption hervorgerufenen Weichmachereffektes bewirken. Einhergehend mit dieser Veränderung könnte dies zu einer Verringerung der Kettenmobilität an der dP(3HB)-Oberfläche führen, was einhergehend mit einer geringeren Abbaugeschwindigkeit wäre. Da allerdings eine Beeinflussung von hydrophoben Wechselwirkungen erst bei sehr hohen Salzkonzentrationen auftritt, ist es wahrscheinlich, dass vornehmlich die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der Substratbindedomäne und dem Substrat hierfür verantwortlich sind. Eine Abhängigkeit der Abbaurate von der Salzkonzentration beobachtete auch Kasuya et al. [1995], der den Abbau von dP(3HB)-Filmen mit der dP(3HB)-Depolymerase aus *Alcaligenes faecalis* T1 bei unterschiedlichen Phosphatpufferkonzentrationen untersuchte.

Auf Basis der Beobachtungen zum Abbau von SP 4/6-Nanopartikel und dP(3HB)-Granula in Gegenwart unterschiedlicher NaCl-Salzkonzentrationen mit PhaZ5 kann bestehend zum Domänenmodell (Kap. 3.4) ein alternatives Modell zur enzymatischen Hydrolyse von dP(3HB)-Depolymerasen auf kristallinen dP(3HB)-Oberflächen formuliert werden. Der postulierte Weichmachereffekt scheint entscheidend für die katalytische Reaktion an dP(3HB) zu sein, worauf die außergewöhnliche Eigenschaft von dP(3HB)-Depolymerasen hochschmelzendes dP(3HB) hydrolysieren zu können, hinweist. Durch die zunehmende Belegung der Polyesteroberfläche mit Enzym könnte die spezifische Interaktion der SBD mit dem Substrat eingeschränkt werden und dadurch die Intensität des Weichmachereffektes und somit auch die Hydrolyse der Estergruppen auf der Polymeroberfläche abnehmen. Bei der Hydrolyse synthetischer Polyester wie SP4/6 findet keine spezifische Adsorption über die SBD sondern eine unspezifische hydrophobe Anheftung an der Polymeroberfläche statt, und es tritt dementsprechend kein Weichmachereffekt bei der Adsorption auf, der bei zunehmender Belegung behindert werden könnte – dementsprechend wird beim Abbau der synthetischen Polyester auch kein Maximumsverhalten der Aktivität in Abhängigkeit von der Enzymbelegung beobachtet.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zum Abbauverhalten von Polyestern durch die Hydrolasen rTfH und PsL sowie durch die dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 bestätigen das Postulat, dass der primär begrenzende Faktor für den hydrolytischen Abbau von wasserunlöslichen Polyestern in erster Linie die Kettenmobilität der Polymerketten in den kristallinen Domänen darstellt. Eine ausreichende Mobilität kann entweder durch die Annäherung der Messtemperatur an den Polyesterschmelzpunkt oder aber auch durch eine spezifische Interaktion des Enzyms mit dem Substrat herbeigeführt (bei dP(3HB)-Depolymerasen und dP(3HB)) werden.

Trotz der dominierenden Rolle der Kettenmobilität bei der Bioabbaubarkeit von Polymeren ist natürlich die sterische Kompabilität des aktiven Zentrums mit der chemischen Umgebung der Estergruppen Voraussetzung für den Abbau synthetischer Polyester mit aliphatischen und aromatischen Strukturkomponenten. Für die hier untersuchten Hydrolasen kann ein identischer katalytischer Mechanismus, der bei den α/β -Hydrolasen durch die katalytische Triade Ser-His-Asp gebildet wird, angenommen werden [Ollis et al. 1992]. Dabei wirkt der Serinrest als Nukleophil und wird durch den Histidin- und Aspartatrest stabilisiert (Kap. 3.1.1).

Analog zu den Untersuchungsergebnissen von Marten et al. [2003], die zeigte, dass Molekülbereiche mit starren Strukturkomponenten, wie sie bei aromatischen Esterverbindungen vorliegen, langsamer hydrolysiert werden als beispielsweise aliphatische Strukturbereiche, erfolgte in den hier durchgeführten Experimenten die Hydrolyse der Estergruppen in rein aliphatischen Polyestern durch rTfH und PsL in der Regel schneller als in den aliphatisch-aromatischen Copolyestern (Kap. 5.2.3.1), wobei rTfH die Polyester deutlich schneller hydrolysierte als PsL. Dieser Unterschied war besonders beim Abbau der aliphatisch-aromatischen Copolyester und bei PET-Nanopartikeln ausgeprägt. Hier ergaben sich Aktivitätsunterschiede in der Größenordnung von dem zwei- bis fünffachen bzw. bei den PET-Nanopartikeln sogar in der Größenordnung von dem 20fachen. Ähnliches wurde bereits beim Abbau von semikristallinen PET-Filmen beobachtet, wobei bei diesen Abbauuntersuchungen mit PsL, wTfH, rTfH und einer Lipase aus *Candida antarctica* nur mit der Hydrolase aus *Thermobifida fusca* überhaupt eine Erosion von PET-Filmen beobachtet wird [Müller et al. 2005]. Die Ergebnisse zeigen, dass sich in die Substrattasche der rTfH Polyesterketten mit starren Strukturelementen vermutlich besser einpassen als in die der PsL. Diese Hypothese wird durch die Struktur der Substrattasche, die sich aus dem dreidimensionalen Proteinmodell der TfH ergibt, unterstützt. Das aktive Zentrum ist in einer frei zugänglichen hydrophoben Furche eingebettet (Abb. 5-20). Eine „Deckel“-Domäne wurde nicht festgestellt. Über die räumlichen Verhältnisse der Substrattasche der rTfH können keine direkten Aussagen gemacht werden, da leider zum Abschluß dieser Arbeit die dreidimensionale Proteinstruktur ausreichender Auflösung und Genauigkeit für dieses Enzym aus einer Röntgenstrukturanalyse noch nicht abschließend ausgewertet war.

Allerdings zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Untersuchungen, dass rTfH nicht generell eine höhere hydrolytische Aktivität gegenüber Estersubstraten aufweist. Bei den Messungen zum Substratspektrum gegenüber den wasserunlöslichen Triglyceridemulsionen lagen bei PsL die Abbauraten in der Regel um einen Faktor von 1,3 bis 1,6 höher als bei der rTfH (Abb. 5-17). Eine weitere Besonderheit bildete der Abbau des verzweigt-kettigen aliphatischen Polyesters dP(3HB), der von rTfH unerwartet langsam hydrolysiert wurde (Abb. 5-35). Eine Ursache hierfür könnte die Seitengruppe im dP(3HB) sein, die bei rTfH bei der Ausrichtung der Estergruppe zur katalytischen Triade hin hinderlich ist. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass scheinbar nur geringfügige Änderungen in der chemischen Struktur um die Estergruppe herum das Einpassen der Estergruppe in das katalytische Zentrum und somit auch die Geschwindigkeit des Abbaus der jeweiligen Estersubstrate stark beeinflussen können.

Im Vergleich zu PsL und rTfH zeichnete sich PhaZ5 durch eine hohe Substratspezifität aus. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten aus verschiedenen Literaturstellen [Kasuya et al. 1999, Jaeger et al. 1995]. Demnach ist das katalytische Zentrum vermutlich sehr spezifisch für die Struktur von dP(3HB) als verzweigt-kettigen Polyester.

Die Untersuchungen ergaben, dass PhaZ5 trotz der hohen Spezifität gegenüber dP(3HB) generell auch die unverzweigten aliphatischen Polyester SP 4/6 und PCL angreifen kann (Abb. 5-29 und Abb. 5-30). Damit wurde erstmals eine Erosion dieser Polyester durch eine dP(3HB)-Depolymerase nachgewiesen, wenngleich der Abbau synthetischer Polyester mit der dP(3HB)-Depolymerase deutlich langsamer verlief als mit anderen Hydrolasen wie PsL oder rTfH. Mit PhaZ5 wurde beispielsweise unter enzymkontrollierten Bedingungen an SP 4/6-Nanopartikeln eine Abbaurate von ca. $0,05 \mu\text{mol min}^{-1}$ erzielt, während der Abbau mit der wTfH und PsL innerhalb von Sekunden bei Abbauraten von mehr als $5 \mu\text{mol min}^{-1}$ erfolgte [Herzog et al. 2006]. Dies verdeutlicht einmal mehr, dass das katalytische Zentrum der dP(3HB)-Depolymerase PhaZ5 offenbar spezifisch für den Abbau von dP(3HB) ausgelegt ist.

Neben der Aktivität gegenüber aliphatischen und aromatischen Strukturen unterscheiden sich PsL und rTfH auch wesentlich hinsichtlich ihrer Grenzflächenaktivierung. Im Gegensatz zur PsL wurde für rTfH keine Grenzflächenaktivierung nachgewiesen, was sich auch neben der Lipaseaktivität in der ausgeprägten Esteraseaktivität für dieses Enzym dokumentiert (Kap. 5.2.2.3). Die Messdaten zur fehlenden Grenzflächenaktivierung von rTfH werden durch das dreidimensionale Proteinmodell gestützt, in dem das in einer hydrophoben Furche gelegene katalytische Zentrum nicht von einer „Deckel“-Domäne bedeckt ist (Abb. 5-20). Da für die kommerzielle PsL keine genauen Angaben zur Species verfügbar sind und somit auch keine dreidimensionale Proteinstruktur identifiziert werden kann, konnte kein direkter Vergleich der Strukturen von rTfH und PsL durchgeführt werden. Allerdings zeigen verfügbare Röntgenstrukturen anderer *Pseudomonas* Lipasen, dass das aktive Zentrum hier von einer „Deckel“-Domäne bedeckt ist [Nardini et al. 2000, Noble et al. 1993]. Dies steht auch in Übereinstimmung mit den Messungen zur Grenzflächenaktivierung, bei der für PsL nach Überschreiten der CMC ein sprunghafter Anstieg der Enzymaktivität beobachtet wurde (Abb. 5-16). Da bisher noch keine Lipase mit Grenzflächenaktivierung isoliert wurde, die keine „Deckel“-Domäne besitzt [Verger 1997], kann bei der PsL mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass eine „Deckel“-Domäne das aktive Zentrum abdeckt. Jedoch weisen die, wenn auch geringen Aktivitäten gegenüber wasser-

löslichen niedermolekularen Estern (Tab. 5-8) darauf hin, dass diese „Deckel“-Domäne wohl kein starres Strukturelement bildet, welches nur ausschließlich nach Adsorption an der hydrophoben Matrix das aktive Zentrum freigibt, sondern im gewissen Umfang auch bei dem in Lösung befindlichen Enzym für Substrate zugänglich ist. Diese Vermutung wird durch Röntgenstrukturanalysen der Lipase aus *Humicola lanuginosa* gestützt [Derewenda et al. 1994]. Die Autoren zeigten, dass die „Deckel“-Domäne dieses Enzymes nicht starr ist und auch im wässrigen Milieu Konformationsänderungen vornimmt. Als Folge dessen können so offenbar auch wasserlösliche Estersubstrate in beschränktem Umfang in das katalytische Zentrum diffundieren.

Die detaillierte Untersuchung der Abbauraten beider Hydrolasen gegenüber wasserlöslichen Esterverbindungen mit aliphatischen oder aromatischen Strukturkomponenten belegt die Beobachtungen, die bei den unterschiedlichen Polyestern gemacht wurden. Bei rTfH wurden für die wasserlöslichen aromatischen Oligomere BT und BTB (B: Butandiol; T:Terephthalsäure) Abbauraten bestimmt, die um Größenordnungen von drei Zehnerpotenzen kleiner waren als die für aliphatische Ester, während für PsL sich die Abbauraten sogar um vier Zehnerpotenzen unterschieden (Tab. 5-8). Die im Vergleich zu rTfH insgesamt um etwa das 200fache niedrigeren Hydrolyseraten von PsL an wasserlöslichen aromatischen Substraten deuten wieder auf unterschiedliche Strukturen in Bezug auf eine „Deckel“-Domäne hin. Die unterschiedlichen Aktivitäten gegenüber aliphatischen und aromatischen Komponenten lassen sich in Bezug auf unterschiedliche sterische Gegebenheiten innerhalb der aktiven Zentren der Enzyme deuten.

Diese Unterschiede bedingen offensichtlich auch das unterschiedliche Verhalten beider Enzyme in Bezug auf den Umsetzungsgrad an verfügbaren Estergruppen in Polyestern. Beide Enzyme depolymerisieren verschiedene Polyester so weit, bis das Polymermaterial vollständig aufgelöst ist und nur noch wasserlösliche Intermediate vorliegen (Kap. 5.2.3.2 und [Kleeberg et al. 2005]). Abhängig von der Hydrophobizität der Intermediate können die sich von der Polyesteroberfläche ablösenden Abbauprodukte als Oligomere aber noch Estergruppen enthalten. rTfH, mit seinem frei zugänglichem aktiven Zentrum und der damit verbundenen nicht notwendigen Grenzflächenaktivierung hydrolysiert auch die gelösten Intermediate weiter bis ein vollständiger Umsatz aller Estergruppen vorliegt, und die Polyesterketten in die Monomere zerlegt sind. PsL hat hingegen durch die nötige Grenzflächenaktivierung nur eine solch geringe Esteraseaktivität gegenüber den wasserlöslichen Intermediaten, dass ein Umsatz gelöster Abbauprodukte unter den Rahmenbedingungen des Versuches kaum erkennbar ist. Der Umsatz an Estern erreicht nur

Werte im Bereich von etwa 50 % der verfügbaren Ester im Polymer (Plateau in den Titrationskurven; siehe Abb. 5-23).

In Abb. 5-38 ist eine Zusammenfassung der wesentlichen Einflussfaktoren für den enzymatischen Bioabbau von Polyestern, basierend auf Literaturaussagen und den hier durchgeführten eigenen Untersuchungen in der Rangfolge ihrer Relevanz gezeigt. Den wichtigsten und entscheidenden Faktor stellt die Kettenmobilität der Polymerketten in den kristallinen Domänen auf der Polymeroberfläche dar und entscheidet über einen initialen Angriff der Hydrolasen. Des Weiteren ist neben dem Abbau semikristalliner Polyester der Abbau amorpher Nanopartikel dargestellt. Welzel [Welzel 2000] stellte in systematischen Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Nanopartikeln fest, dass im Gegensatz zu den semikristallinen Polyestern der Abbau durch die Temperaturdifferenz zwischen der Polymerglastemperatur (T_G) und der Messtemperatur kontrolliert wird. Allerdings liegt beispielsweise der T_G aliphatischer Polyester in der Regel deutlich unterhalb der Messtemperatur und spielt daher kaum eine Rolle. Die Polyesterketten sollten daher in einem Zustand maximaler Mobilität vorliegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde allerdings der Einfluss der Glastemperatur auf den Bioabbau von Nanopartikeln außer Betracht gelassen und ist hier nur als eine Ergänzung zu betrachten.

Anschließend folgen strukturspezifische Faktoren wie die räumlichen Verhältnisse des katalytischen Zentrums, die eine korrekte Ausrichtung des Substrates zur katalytischen Triade voraussetzen. In Abb. 5-38 wird dabei eine Unterteilung in polyesterspaltende Hydrolasen mit hoher bzw. mit niedriger Strukturspezifität vorgenommen. Eine Hydrolase mit niedriger Strukturspezifität ist bezüglich der in dieser Arbeit verwendeten Hydrolasen die rTfH. rTfH weist gegenüber einer Vielzahl der hier untersuchten synthetischen Polyester hohes Abbaupotential auf. Im Gegensatz dazu steht die PsL, die gegenüber aliphatisch-aromatischen Copolyestern nur eingeschränkt aktiv ist, welches in den Untersuchungen zur Verteilung der Polyesterspaltprodukte deutlich gezeigt wurde (Kap. 5.2.3.2). Abschließend scheint das Phänomen der Grenzflächenaktivierung eines Enzyms darüber zu entscheiden, inwiefern auch eine Hydrolyse der Estergruppen in den wasserlöslichen Polyesterintermediaten stattfinden kann. Allerdings ist dieser Prozess von der reinen enzymatischen Oberflächenerosion des Polymers abgekoppelt und ist daher für den Bioabbau des Polymers nicht direkt entscheidend.

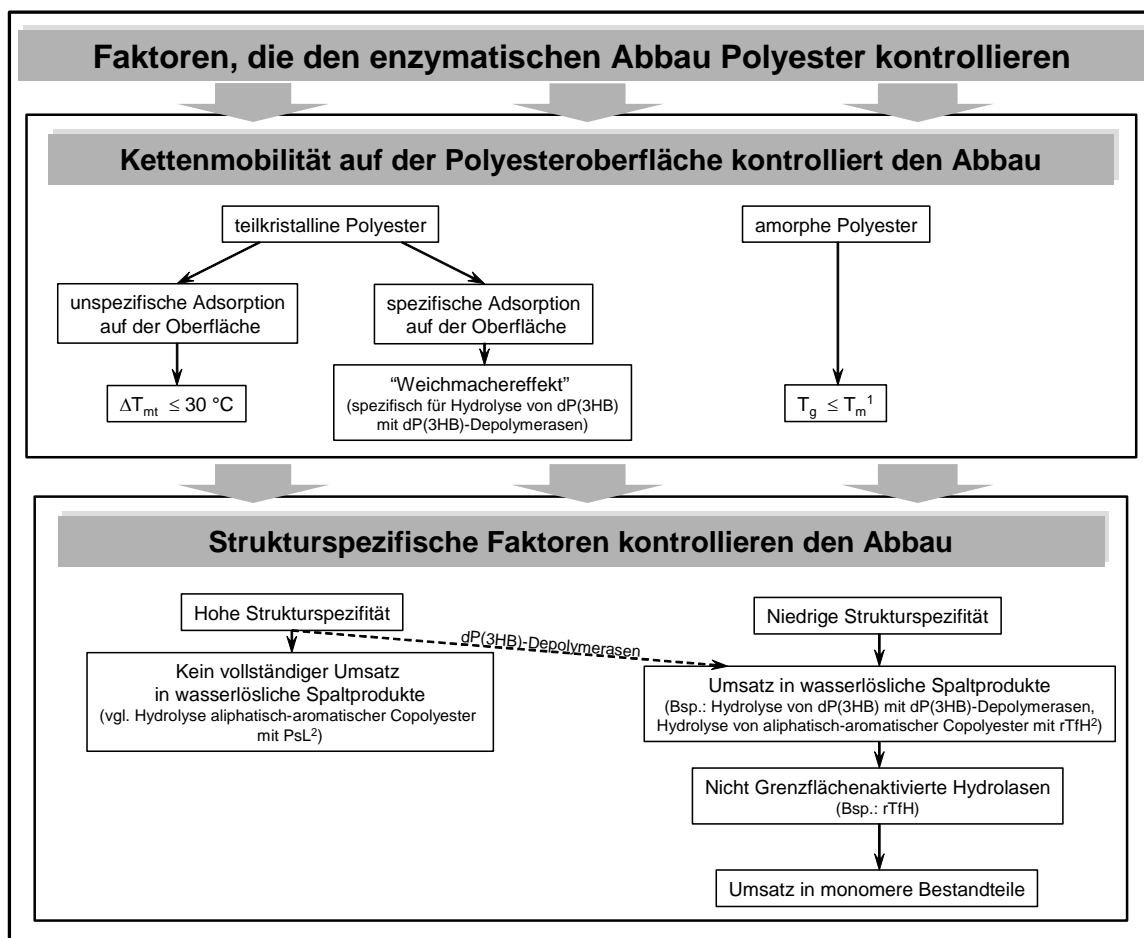


Abb. 5-38: Faktoren, die die enzymatisch katalysierte Hydrolyse von Estergruppen auf festen wasserunlöslichen Polyesteroberflächen kontrollieren. ¹Welzel [2000] , ²Siehe Erläuterungen im Text.

Aus den oben gezeigten Charakteristika, der Hydrolase aus *Thermobifida fusca* erhebt sich die Frage, wie dieses Enzym zu klassifizieren und welcher Enzymgruppe es zuzuordnen ist. TfH müsste hinsichtlich der in Tab. 5-9 aufgeführten Enzymcharakteristika und der in Kap. 3.2.1 gegebenen Enzymdefinitionen der Gruppe der Lipasen zugeordnet werden, da sie im Gegensatz zu den Esterasen die Hydrolyse wasserunlöslicher Triglyceride katalysiert. Im Vergleich zu typischen mikrobiellen Lipasen, wie zum Beispiel der Lipase aus *Candida rugosa* oder *Rhizomucor miehei* zeigt die rTfH allerdings das für Lipasen häufig als wichtiges Kriterium genannte Phänomen der Grenzflächenaktivierung nicht (Kap. 3.2.1). Durch dieses Hydrolyseverhalten weist die rTfH auch gegenüber wasserlöslichen Esterverbindungen hohe katalytische Aktivität auf und besitzt somit neben der Lipaseaktivität auch typische Esteraseeigenschaften (Tab. 5-9). Kleeberg et al. [2005] beobachtete dieses Hydrolyseverhalten bereits beim Abbau des rein aliphatischen Polyesters SP 4/6. Die Abbauuntersuchungen wurden damals mit der Wildstamm-TfH, der Lipase PsL und einer

Lipase aus *Aspergillus oryzae* durchgeführt (AoL). Im Gegensatz zu den anderen Lipasen wurde ein SP 4/6 Film durch die TfH vollständig in seine Monomere hydrolysiert. Aufgrund der hohen Lipase- und Esteraseaktivität vermuteten Kleeberg et al. [2005], dass die TfH offenbar als Cutinase (Kap. 3.3) zu klassifizieren wäre. TfH wurde daraufhin auf ihre Cutinaseaktivität hin überprüft, welche dann auch für die TfH nachgewiesen wurde. Parallel zu diesen Messungen wurde aber ebenfalls für die PsL eine Cutinaseaktivität nachgewiesen. Die Autoren schlossen daraus, dass eine Einordnung der TfH hinsichtlich der katalytischen Aktivität gegenüber definierter Estersubstrate wohl nicht möglich ist. Ein identisches Bild ergibt sich aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Klassifizierung der rTfH. Daher stellt sich die Frage, ob überhaupt eine eindeutige Trennung der Hydrolasen in Esterasen, Lipasen und Cutinasen in Bezug auf das Substratspektrum möglich ist.

Eine weitere Möglichkeit hydrolytische Enzyme zu charakterisieren, ist die Klassifizierung anhand der Aminosäuresequenz der Enzyme [Arpigny und Jaeger 1999, Pleiss et al. 2000]. Argigny und Jaeger gruppierten bakterielle lipolytische Enzyme auf der Grundlage struktureller und katalytischer Merkmale in acht Familien (Kap. 3.2.2). Mit Hilfe dieser Einteilung lässt sich die Hydrolase aus *Thermobifida fusca* in die Familie III, in der auch Lipasen aus *Streptomyces exfoliatus*, *Streptomyces albus* und *Moraxella sp.* vertreten sind, einordnen. In der "Lipase-Engineering Database" (LED) [Pleiss et al. 2000] hingegen ist die TfH innerhalb des GX-Typus (Kap. 3.2.2) in der Gruppe der "Moraxella Lipase I Ähnlichen" wiederzufinden, zu denen zusätzlich zu denen in der Familie III aufgelisteten auch die PBS(A)-Depolymerase aus *Acidovorax delafieldii* und die Lipase aus *Kineococcus radiotolerans* SRS30216 gehören. Sowohl in der Datenbank von Arpigny und Jaeger [1999] als auch in der LED ist die TfH bis auf eine Ausnahme (PBS(A)-Depolymerase aus *Acidovorax delafieldii*) neben Lipasen wiederzufinden. Die Gruppe der Cutinasen, welche nur in der LED berücksichtigt wird, sind zwar auch dem GX-Typus zugeordnet, allerdings sind die Aminosäuresequenzhomologien zwischen den Cutinasen und der "Moraxella Lipase I Ähnlichen" gering. Auf Grundlage beider Datenbanken wäre die TfH somit als Lipase einzustufen. Abschließend zeigen diese Ausführungen, dass eine eindeutige Klassifizierung der TfH offenbar nur hinsichtlich der Aminosäuresequenz möglich ist. Aufgrund des breiten Substratspektrums der TfH, welches die enzymatische Hydrolyse von Esterbindungen in wasserlöslichen niedermolekularen und wasserunlöslichen sowohl niedermolekularen als auch hochmolekularen Substraten umfasst, wird die Einordnung des Enzyms erschwert. Basierend auf den vorgestellten Richtlinien zur Gruppierung von Enzymen müsste die TfH in die Gruppe der Lipasen einzuordnen sein, da hier die meisten Übereinstimmungen vorliegen.

6 Literatur und Internet-Adressen

6.1 Literaturverzeichnis

DIN 54900-2 (1998). Prüfung der Kompostierbarkeit von Kunststoffen. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH. DIN 54900-2. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH.

Abe H, Doi Y (1999). Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. *Int J Biol Macromol* 25:185-192

Abe H, Matsubara I, Doi Y (1995). Physical properties and enzymatic degradability of polymer blends of bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly[R,S]-3-hydroxybutyrate] stereoisomers. *Macromolecules* 28:844-853

Abouhamad WN, Manson M, Gibson MM, Higgins CF (1991). Peptide transport and chemotaxis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: characterization of the dipeptide permease (Dpp) and the dipeptide-binding protein. *Mol Microbiol* 5:1035-1047

Alisch-Mark M, Herrmann A, Zimmermann W (2006). Increase of the hydrophilicity of polyethylene terephthalate fibres by hydrolases from *Thermomonospora fusca* and *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Biotechnol Letters* 28:681-685

Aminabhavi TM, Balundgi RH, Cassidy PE (1990). A review on biodegradable plastics. *Polym-Plast Technol Eng* 39:235-262

Arenskötter M, Baumeister D, Berekaa MM, Pötter G, Kroppenstedt RM, Linos A, Steinbüchel A (2001). Taxonomic characterization of two rubber degrading bacteria belonging to the species *Gordonia polyisoprenivorans* and analysis of hyper variable regions of 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* 205:277-282

Arpigny JL, Jaeger KE (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343 Pt 1:177-183

Behrends A, Klingbeil B, Jendrossek D (1996). Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases bind to their substrate by a C-terminal located substrate binding site. *FEMS Microbiol Lett* 143:191-194

Belev TN, Singh M, McCarthy JE (1991). A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*. *Plasmid* 26:147-150

Bisswanger (1979). Theorie und Methoden der Enzymkinetik. Verlag Chemie, GmbH, Weinheim

Bode HB, Kerkhoff K, Jendrossek D (2001). Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Biomacromolecules* 2:295-303

Braaz R, Wong S-L, Jendrossek D (2002). Production of PHA depolymerase A (PhaZ5) from *Paucimonas lemoignei* in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* 209:237-241

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Høge-Jensen B, Nørskov L, Thim L, Menge U (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343:767-770

- Broedel SH, Papciak SM, Jones WR** (2001). The selection of optimum media formulations for improved expression of recombinant proteins in *E. coli*. Athena Enzyme Systems Technical Bulletin Vol.2, January 2001
- Brzozowski AM, Derewenda U, Derewenda ZS, Dodson GG, Lawson DM, Turkenburg JP, Bjorkling F, Huge-Jensen B, Patkar SA, Thim L** (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 351:491-494
- Carriere F, Thirstrup K, Boel E, Verger R, Thim L** (1994). Structure-function relationships in naturally occurring mutants of pancreatic lipase. *Prot Eng* 7:563-569
- Carter P, Bedouelle H, Winter G** (1985). Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res* 13:4431-4443
- Chahinian H, Nini L, Boitard E, Dubès J-P, Comeau L-C, Sarda L** (2002). Distinction between esterases and lipases: A kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids* 37:653-662
- Chiellini E, Corti A, D'Antone S, Solaro R** (2003). Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Prog Polym Sci (Oxford)* 28:963-1014
- Choi JH, Lee SY** (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:625-635
- Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz Jr. KM, Ferguson DM, Spellmeyer DC, Fox T, Caldwell JW, Kollman PA** (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J Am Chem Soc* 117:5179-5197
- Cygler M, Schrag JD** (1997). Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Methods Enzymol* 284:3-27
- Cygler M, Schrag JD** (1999). Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochim Biophys Acta* 1441:205-214
- de Geus P, Lauwereys M, Matthyssens G** (1989). European Patent Application: No. PCT 89.400.462.1.
- Deckwer WD, Müller RJ, van den Heuvel J, Kleeberg I, Widow U** (2001). DNA-Sequenzen, die Estergruppen spaltende Enzyme kodieren. Bundesrepublik Deutschland DE 100 30 529 A1.
- Derewenda U, Brzozowski AM, Lawson DM, Derewenda ZS** (1992). Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* 31:1532-1541
- Derewenda U, Swenson L, Wei Y, Green R, Kobos PM, Joerger R, Haas MJ, Derewenda ZS** (1994). Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *J Lipid Res* 35:524-534
- Desnuelle P, Sarda L, Ailhaud G** (1960). Inhibition de la lipase pancréatique pa, le diéthyl-*p*-nitrophényl phosphate en emulsion. *Biochim Biophys Acta* 37:570-571
- Doi Y** (1990). Microbial Polyesters. VCH Publishers, New York
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127-6145
- Driessen AJM, Manting EH, van der Does C** (2001). The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat Struct Biol* 8:492-498

- Eggert T, van Pouderooyen G, Pencreac'h G, Douchet I, Verger R, Dijkstra BW, Jaeger KE** (2002). Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 26:37-46
- Egmond MR, de Vlieg J** (2000). *Fusarium solani pisi* cutinase. *Biochimie* 82:1015-1021
- Eijkmann C** (1901). Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *Centralbl. Bakteriologie* 29:841-848
- Eldsäter C, Erlandsson B, Renstad R, Albertsson A-C, Karlsson S** (2000). The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly(ϵ -caprolactone). *Polymer* 41:1297-1304
- Ferrato F, Carriere F, Sarda L, Verger R** (1997). A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods Enzymol* 286:327-347
- Fischer M, Pleiss J** (2003). The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res* 31:319-321
- Focarete ML, Ceccorulli G, Scandola M, Kowalczyk M** (1998). Further evidence of crystallinity-induced biodegradation of synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate) by PHB-depolymerase A from *Pseudomonas lemoignei*. Blends of atactic poly(3-hydroxybutyrate) with crystalline polyesters. *Macromolecules* 31:8485-8492
- Fojan P, Jonson PH, Petersen MTN, Petersen SB** (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* 82:1033-1041
- Franken SM, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkstra BW** (1991). Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes. *Embo J* 10:1297-1302
- Fujita M, Kobori Y, Abe H, Doi Y, Hiraishi T, Aoki Y, Matsumoto N** (2005). Interaction between poly[R]-3-hydroxybutyrate depolymerase and biodegradable polyesters evaluated by atomic force microscopy. *Langmuir* 21:11829-11835
- Ghosh D, Wawrzak Z, Pletnev VZ, Li N, Kaiser R, Pangborn W, Jornvall H, Erman M, Duax WL** (1995). Structure of uncomplexed and linoleate-bound *Candida cylindracea* cholesterol esterase. *Structure* 3:279-288
- Gitlesen T, Bauer M, Adlercreutz P** (1997). Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochim Biophys Acta* 1345:188-196
- Gouda MK, Kleeberg I, van den Heuvel J, Müller RJ, Deckwer WD** (2002). Production of a polyester degrading extracellular hydrolase from *Thermomonospora fusca*. *Biotechnol Prog* 18:927-934
- Grochulski P, Li Y, Schrag JD, Bouthillier F, Smith P, Harrison D, Rubin B, Cygler M** (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem* 268:12843-12847
- He Y, Shuai X, Kasuya K, Doi Y, Inoue Y** (2001). Enzymatic degradation of atactic poly(R,S-3-hydroxybutyrate) induced by amorphous polymers and the enzymatic degradation temperature window of an amorphous polymer system. *Biomacromolecules* 2:1045-1051
- Herzog K, Müller RJ, Deckwer WD** (2006). Mechanism and kinetics of the enzymatic hydrolysis of polyester nanoparticles by lipases. *Polym Degrad Stab* 91:2486-2498

- Heukeshoven J, Dernick R** (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9:28-32
- Hiraishi T, Hirahara Y, Doi Y, Maeda M, Taguchi S** (2006). Effects of mutations in the substrate-binding domain of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] (PHB) depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 on PHB degradation. *Appl Env Microbiol* 72:7331-7338
- Hisano T, Kasuya K, Tezuka Y, Ishii N, Kobayashi T, Shiraki M, Oroudjev E, Hansma H, Iwata T, Doi Y, Saito T, Miki K** (2006). The Crystal Structure of Polyhydroxybutyrate Depolymerase from *Penicillium funiculosum* Provides Insights into the Recognition and Degradation of Biopolyesters. *J Mol Biol* 356:993-1004
- Hjorth A, Carriere F, Cudrey C, Woldike H, Boel E, Lawson DM, Ferrato F, Cambillau C, Dodson GG, Thim L, Verger R** (1993). A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase. *Biochemistry* 32:4702-4707
- Hoekstra D, van der Laan JW, de Leij L, Witholt B** (1976). Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 455:889-899
- Hoffmann F, Rinas U** (2000). Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 16:1000-1007
- Holmquist M** (2000). Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms. *Curr Prot Pept Sci* 1:209-235
- Holwerda K, Verkade PE, Willigen AHA** (1936). Vergleichende Untersuchungen über die Verseifungsgeschwindigkeit einiger einsäuriger Triglyceride unter Einfluß von Pankreasextrakt. *Rec Trav Chim Pays-Bas* 55:43-57
- Huang SJ** (1985). Biodegradable polymers. *Enzyc Polym Sci Eng* 2:220-241
- Iwata T, Doi Y** (1999). Crystal structure and biodegradation of aliphatic polyester crystals. *Macromol Chem Phys* 200:2429-2442
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT** (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53:315-351
- Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O** (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 15:29-63
- Jaeger KE, Ransac S, Koch HB, Ferrato F, Dijkstra BW** (1993). Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters* 332:143-149
- Jaeger KE, Steinbüchel A, Jendrossek D** (1995). Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: Bacterial lipases hydrolyze poly(ω -hydroxyalkanoates). *Appl Env Microbiol* 61:3113-3118
- Jendrossek D, Frisse A, Behrends A, Andermann M, Kratzin HD, Stanislawski T, Schlegel HG** (1995). Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system. *J Bacteriol* 177:596-607
- Jendrossek D, Handrick R** (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol* 56:403-432

- Kaplan DL, Mayer JM, Ball D, McCassie J, Allen AL, Stenhouse P** (1993). Fundamentals of Biodegradable Polymers. In Ching C, Kaplan DL, Thomas E (eds) Biodegradable Polymers and Packaging. pp 1-42
- Kasuya K, Ohura T, Masuda K, Doi Y** (1999). Substrate and binding specificities of bacterial polyhydroxybutyrate depolymerases. *Int J Biol Macromol* 24:329-336
- Kasuya K-I, Inoue Y, Doi Y** (1996). Adsorption kinetics of bacterial PHB depolymerase on the surface of polyhydroxyalkanoate films. *Int Journal Biol Macromol* 19:35-40
- Kasuya K-I, Inoue Y, Yamada K, Doi Y** (1995). Kinetics of surface hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *Polym Degrad Stab* 48:167-174
- Kawai F** (1995). Breakdown of plastics and polymers by microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 52:151-194
- Kawai F, Watanabe M, Shibata M, Yokoyama S, Sudate Y** (2002). Experimental analysis and numerical simulation for biodegradability of polyethylene. *Polym Degrad Stab* 76:129-135
- Kikkawa Y, Fujita M, Hiraishi T, Yoshimoto M, Doi Y** (2004). Direct observation of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase adsorbed on polyester thin film by atomic force microscopy. *Biomacromolecules* 5:1642-1646
- Kikkawa Y, Kaneshato M, Yamashita K, Hiraishi T, Doi Y** (2005). Dynamic adsorption behavior of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase onto polyester surface investigated by QCM and AFM. *Biomacromolecules* 6:2084-2090
- Kleeberg I** (1999). Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von aliphatisch-aromatischen Copolyestern sowie Isolierung und Charakterisierung eines polyesterspaltenden Enzyms. Dissertation. Technische Universität Braunschweig, Deutschland.
- Kleeberg I, Hetz C, Kroppenstedt RM, Müller RJ, Deckwer WD** (1998). Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates. *Appl Environ Microbiol* 64:1731-1735
- Kleeberg I, Welzel K, van den Heuvel J, Müller RJ, Deckwer WD** (2005). Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters. *Biomacromolecules* 6:262-270
- Kolattukudy PE** (1984). Cutinases from Fungi and Pollen. In Borgström B, Brockman H (eds) Elsevier, Amsterdam. pp 471-504
- Korz DJ** (1993). Entwicklung von Prozeßstrategien zur Kultivierung von *Escherichia coli* zu hohen Zelldichten. Technische Universität München, Deutschland.
- Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD** (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 39:59-65
- Koutny M, Lemaire J, Delort AM** (2006). Biodegradation of polyethylene films with prooxidant additives. *Chemosphere* 64:1243-1252
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

- Lee SY** (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. Trends Biotechnol 14:98-105
- Lenz RW** (1993). Biodegradable polymers. Adv Polym Sci 107:X-40
- Liao D-I, Remington SJ** (1990). Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution. A new class of serine proteinase. J Biol Chem 265:6528-6531
- Longhi S, Cambillau C** (1999). Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. Biochim Biophys Acta 1441:185-196
- Longhi S, Czjzek M, Lamzin V, Nicolas A, Cambillau C** (1997a). Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. J Mol Biol 268:779-799
- Longhi S, Mannesse M, Verheij HM, De Haas GH, Egmond M, Knoops-Mouthuy E, Cambillau C** (1997b). Crystal structure of cutinase covalently inhibited by a triglyceride analogue. Protein Sci 6:275-286
- Lynd LR, Weimer PJ, Zyl WH, Pretorius IS** (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiol Mol Biol Rev 66:506-577
- Mañcheno JM, Pernas MA, Martínez MJ, Ochoa B, Rúa ML, Hermoso JA** (2003). Structural insights into the lipase/esterase behavior in the *Candida rugosa* lipases family: Crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97 Å resolution. J Mol Biol 332:1059-1069
- Mannesse MLM, Cox RC, Koops BC, Verheij HM, De Haas GH, Egmond MR, Van der Hijden HTWM, De Vlieg J** (1995). Cutinase from *Fusarium solani* pisi hydrolyzing triglyceride analogues. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. Biochemistry 34:6400-6407
- Marten E** (2000). Korrelation zwischen der Struktur und der enzymatischen Hydrolyse von Polyestern. Dissertation. Technische Universität Braunschweig, Germany.
- Marten E, Müller RJ, Deckwer WD** (2003). Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters - I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. Polym Degrad Stab 80:485-501
- Marten E, Müller RJ, Deckwer WD** (2005). Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic-aromatic copolyesters. Polym Degrad Stab 88:371-381
- Martinelle M, Holmquist M, Hult K** (1995). On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. Biochim Biophys Acta - Lipids and Lipid Metabol 1258:272-276
- Martinez C, de Geus P, Lauwereys M, Matthysens G, Cambillau C** (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. Nature 356:615-618
- Martinez C, Nicolas A, van Tilbeurgh H, Egloff MP, Cudrey C, Verger R, Cambillau C** (1994). Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. Biochemistry 33:83-89
- Mayer MP, Bukau B** (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. Cell Mol Life Sci 62:670-684
- Miller DM, Kurzban GP, Mendoza JA, Chrigwin JM, Hardies SC, Horowitz PM** (1992). Recombinant bovine liver rhodanase: purification and comparison with bovine liver rhodanase. Biochim Biophys Acta 1121:286-292
- Mori H, Ito K** (2001). The Sec protein-translocation pathway. Trends Microbiol 9:494-500

- Movva NR, Nakamura K, Inouye M** (1980). Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 255:27-29
- Mukai K, Doi Y, Sema Y, Tomita K** (1993a). Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. *Biotechnol Letters* 15:601-604
- Mukai K, Yamada K, Doi Y** (1993b). Kinetics and mechanism of heterogeneous hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHA depolymerases. *Int J Biol Macromol* 15:361-366
- Müller RJ** (2006). Testing of Organic Materials. In Czichos H, Saito T, Smith L (eds) Springer Handbook of Material Measurement Methods. Springer, Germany
- Müller RJ, Kleeberg I, Deckwer WD** (2001). Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *J Biotechnol* 86:87-95
- Müller RJ, Schrader H, Profe J, Dresler K, Deckwer WD** (2005). Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): Rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. *Macromol Rapid Commun* 26:1400-1405
- Murase T, Suzuki Y, Doi Y, Iwata T** (2002). Nonhydrolytic fragmentation of a poly[(R)-3-hydroxybutyrate] single crystal revealed by use of a mutant of polyhydroxybutyrate depolymerase. *Biomacromolecules* 3:312-317
- Murphy CA, Cameron JA, Huang SJ, Vinopal RT** (1996). Fusarium polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Appl Environ Microbiol* 62:456-460
- Nardini M, Dijkstra BW** (1999). Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 9:732-737
- Nardini M, Lang DA, Liebeton K, Jaeger KE, Dijkstra BW** (2000). Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem* 275:31219-31225
- Neidhardt FC, Ingraham JL, Schaechter M** (1990). Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Neves Petersen MT, Fojan P, Petersen SB** (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *J Biotechnol* 85:115-147
- Noble MEM, Cleasby A, Johnson LN, Egmond MR, Frenken LGJ** (1993). The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Letters* 331:123-128
- Okita B, Arcuri E, Turner K, Sharr D, del Tito B, Swanson J, Shatzman A, Zabriskie D** (1989). Effect of induction temperature on the production of malaria antigens in recombinant *E. coli*. *Biotechnol Bioeng* 34
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J** (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 5:197-211
- Parikh M, Gross RA, McCarthy SP** (1993). The Effect of Crystalline Morphology on Enzymatic Degradation Kinetics. In Ching C, Kaplan DL, Thomas E (eds) Biodegradable Polymers and Packaging. pp 159-170
- Pathak D, Ollis D** (1990). Refined structure of diene lactone hydrolase at 1.8 Å. *J Mol Biol* 214:497-525

- Pleiss J, Fischer M, Peiker M, Thiele C, Schmid RD** (2000). Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *J Mol Cat - B Enz* 10:491-508
- Pleiss J, Fischer M, Schmid RD** (1998). Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem Phys Lipids* 93:67-80
- Prompers JJ, Groenewegen A, Hilbers CW, Pepermans HA** (1999). Backbone dynamics of *Fusarium solani pisi* cutinase probed by nuclear magnetic resonance: the lack of interfacial activation revisited. *Biochemistry* 38:5315-5327
- Reichelt J, Dieterich G, Heinz DW, Kvesic M, Schomburg D** (2005). BRAGI: Linking and visualization of database information in a 3D viewer and modeling tool. *Bioinformatics* 21:1291-1293
- Richardson JS** (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Advances in Protein Chemistry* 34:167-339
- Riesenber D** (1991). High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 2:380-384
- Riesenber D, Guthke R** (1999). High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:422-430
- Riesenber D, Schulz V, Knorre WA, Pohl HD, Korz D, Sanders EA, Ross A, Deckwer WD** (1991). High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J Biotechnol* 20:17-27
- Rinas U, Hoffmann F** (2004). Selective leakage of host-cell proteins during high-cell-density cultivation of recombinant and non-recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 20:679-687
- Rothen SA, Sauer M, Sonnleitner B, Witholt B** (1998). Growth characteristics of *Escherichia coli* HB101 [pGec47] on defined medium. *Biotechnol Bioeng* 58:92-100
- Rua ML, Schmidt-Dannert C, Wahl S, Sprauer A, Schmid RD** (1997). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *J Biotechnol* 56:89-102
- Sambrook J, Russell DW** (2001). Molecular cloning: A laboratory Manual 3rd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Sarda L, Desnuelle P** (1958). Action de la lipase pancreatique sur les esters en émulsion. *Biochim Biophys Acta* 30
- Scandola M, Focarete ML, Adamus G, Sikorska W, Kowalczyk M, Jedlin?ski Z, Baranowska I, Œwierczek S, Gnatowski M** (1997). Polymer blends of natural poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and a synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate). Characterization and biodegradation studies. *Macromolecules* 30:2568-2574
- Schlegel HG** (1992). Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart
- Schmidt-Dannert C, Sztajer H, Stocklein W, Menge U, Schmid RD** (1994). Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. *Biochim Biophys Acta* 1214:43-53
- Schomburg D, Reichelt J** (1988). BRAGI: a comprehensive protein modeling program system. *J Mol Graph* 6:161-165

- Schönheyder F, Volquartz K** (1945). On the affinity of pig pancreatic lipase for triacetin in heterogeneous solution. *Acta Physiol Scand* 9:57-67
- Schrag JD, Li YG, Wu S, Cygler M** (1991). Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* 351:761-764
- Seeger A, Schneppe B, McCarthy JEG, Deckwer W-D, Rinas U** (1995). Comparison of temperature- and isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 17:947-953
- Seretoudi G, Bikiaris D, Panayiotou C** (2002). Synthesis, characterization and biodegradability of poly(ethylene succinate)/poly(ϵ -caprolactone) block copolymers. *Polymer* 43:5405-5415
- Shiloach J, Fass R** (2005). Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development. *Biotechnol Adv* 23:345-357
- Shokri A, Sanden AM, Larsson G** (2002). Growth rate-dependent changes in *Escherichia coli* membrane structure and protein leakage. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:386-392
- Shokri A, Sanden AM, Larsson G** (2003). Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:654-664
- Sieblitz D** (2006). laufende Dissertation. Technische Universität, Braunschweig, Deutschland (persönliche Mitteilung).
- Silva CM, Carneiro F, O'Neill A, Fonseca LP, Cabral JSM, Guebitz G, Cavaco-Paulo A** (2005). Cutinase - A new tool for biomodification of synthetic fibers. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem* 43:2448-2450
- Sudesh K, Abe H, Doi Y** (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci* 25
- Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I** (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253:872-879
- Suzuki T** (1979). Degradation of poly(vinyl alcohol) by microorganisms. *J Appl Polym Sci, Appl Polym Symp* 35:431-437
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
- Timmings MR, Lenz RW, Fuller RC** (1997). Heterogeneous kinetics of the enzymatic degradation of poly(β -hydroxyalkanoates). *Polymer* 38:551-562
- Tokiwa Y, Suzuki T** (1977). Hydrolysis of polyesters by lipases. *Nature* 270:76-78
- Tokiwa Y, Suzuki T** (1978). Hydrolysis of Polyesters by *Rhizopus delemar* Lipase. *Agric Biol Chem* 45:1071-1072
- Tokiwa Y, Suzuki T** (1981). Hydrolysis of Copolyesters containing Aromatic and Aliphatic Ester Blocks by Lipase. *J Appl Polym Sci* 26:441-448
- Tonford C** (1961). *Physical Chemistry Of Macromolecules*, vol. 1961. Wiley-VCH, New York, USA

- Tserki V, Matzinos P, Panayiotou C, Pavlidou E, Vachliotis D** (2006). Biodegradable aliphatic polyesters. Part I. Properties and biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate). *Polym Degrad Stab* 91:367-376
- Tsuchii A, Takeda K** (1990). Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Appl Env Microbiol* 56:269-274
- Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA** (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2:293-308
- Vaara M** (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 56:395-411
- van Oort MG, Devere Th. AMJ, Dijkman R, Leuveling Tjeenk M, Verheij HM, De Haas GH, Wenzig E, Gotz F** (1989). Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* 28:9278-9285
- van Pouderooyen G, Eggert T, Jaeger KE, Dijkstra BW** (2001). The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *J Mol Biol* 309:215-226
- Verger R** (1997). "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol* 15:32-38
- Voet D, Voet JG** (1994). Biochemie. VCH, Weinheim
- von Heijne G** (1990). The signal peptide. *J Membrane Biol* 115:195-201
- Warren RAJ** (1996). Microbial Hydrolysis of Polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* 50:183-212
- Wei Y, Swenson L, Castro C, Derewenda U, Minor W, Arai H, Aoki J, Inoue K, Servin-Gonzalez L, Derewenda ZS** (1998). Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution. *Structure* 6:511-519
- Welzel K** (2000). Untersuchungen zum biologischen Abbau von Polyestern in dreidimensionalen Netzwerken. Diplomarbeit. Technische Universität Braunschweig, Deutschland.
- Welzel K** (2003). Korrelationen zwischen der Struktur und der enzymatischen Hydrolyse von Polyestern. Dissertation. Technical University Braunschweig, Germany.
- Wensink J, Witholt B** (1981). Outer-membrane vesicles released by normally growing *Escherichia coli* contain very little lipoprotein. *Eur J Biochem* 116:331-335
- Witt U** (1996). Synthese, Charakterisierung und Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit von anwendungsorientierten biologisch abbaubaren aliphatisch/aromatischen Copolyestern. Dissertation. Technische Universität Braunschweig, Deutschland.
- Witt U, Müller RJ, Augusta J, Widdecke H, Deckwer WD** (1994). Synthesis, properties and biodegradability of polyesters based on 1,3-propanediol. *Macromol Chem Phys* 195:793-802
- Witt U, Müller RJ, Deckwer WD** (1995). New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favorable use properties. *J Polym Env* 3:215-223
- Witt U, Müller RJ, Deckwer WD** (1997). Biologisch abbaubare Polymere -Status und Perspektiven-. Franz-Patat-Zentrum, Braunschweig

Yamane T, Shimizu S (1984). Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, vol. 30. Springer Verlag, Berlin

Yamashita K, Aoyagi Y, Abe H, Doi Y (2001). Analysis of adsorption function of polyhydroxybutyrate depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1 by using a quartz crystal microbalance. Biomacromolecules 2:25-28

Yamashita K, Suzuki Y, Doi Y, Funato T, Teramachi S (2003). Characteristic Interactions between Poly(hydroxybutyrate) Depolymerase and Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Film Studied by a Quartz Crystal Microbalance. Macromol Biosci 3:694-702

Yoo ES, Im SS (1999). Effect of Crystalline and Amorphous Structures on Biodegradability of Poly(Tetramethylene Succinate). J Polym Env 7:19-26

Zhang G, Brokx S, Weiner JH (2006). Extracellular accumulation of recombinant proteins fused to the carrier protein YebF in *Escherichia coli*. Nature Biotechnol 24:100-104

Zor T, Selinger Z (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. Anal Biochem 236:302-308

6.2 Internet-Adressen

Umweltdaten Deutschland Online

<http://www.env-it.de/umweltdaten/>

(Umweltbundesamt, Dessau, Deutschland)

Lipase Engineering Database

<http://www.led.uni-stuttgart.de>

(Universität Stuttgart, Institut für Technische Biochemie, Stuttgart, Deutschland)

7 Anhang

Berechnung der Oberfläche der Nanopartikel und Film

Nanopartikel

$$A_i(d_{pi}) = \pi d_{pi}^2 \quad \text{Gleichung 7-1}$$

$A_i(d_{pi})$ Oberfläche eines Partikels i mit dem Durchmesser d_{pi} (cm²)
 d_{pi} Durchmessers des Partikels i (cm)

Annahme einer monodispersen Partikelgrößenverteilung: $d_{pi}=d_p$

$$A = N_p \pi d_p^2 = \frac{m_t}{m_p} \pi d_p^2 \quad \text{Gleichung 7-2}$$

A Gesamtoberfläche (cm²)
 N_p Anzahl der Partikel
 m_t Gesamtmasse der Nanopartikel (g)
 m_p Masse eines Nanopartikels (g)

Die Masse eines Nanopartikels (m_p) lässt sich mittels der Dichte (ρ_p) berechnen.

$$m_p = \rho_p V_p = \rho_p \frac{1}{6} \pi d_p^3 \quad \text{Gleichung 7-3}$$

ρ_p Dichte (g cm⁻³)
 V_p Volumen eines Partikels (cm³)

Die Gesamtoberfläche lässt sich durch Einsetzen von Gleichung 7-3 in Gleichung 7-2 folglich nach Gleichung 7-4 berechnen.

$$A = \frac{m_t}{\rho_p} \cdot \frac{6}{d_p} \quad \text{Gleichung 7-4}$$

Film

Die Filmoberfläche wurde mittels der Formel zur Berechnung der Oberfläche eines geraden Zylinders abgeschätzt.

$$A = \pi \cdot d_f \cdot h + \frac{\pi \cdot d_f^2}{2} \quad \text{Gleichung 7-5}$$

A Gesamtoberfläche (cm²)
 d_f Filmdurchmesser (cm)
h Filmhöhe (cm)

Berechnung der theoretischen Enzymbelegung auf einer Polyesteroberfläche

Der Radius eines globulären Enzyms nach Tonford [1961] ergibt sich aus Gleichung 7-6.

$$r = 0,72 \cdot M^{\frac{1}{3}} \quad \text{Gleichung 7-6}$$

r Radius eines globulären Proteins (\AA , 10^{-8} cm)
 M Molekulargewicht (g mol^{-1})

Die Anzahl der Enzymmoleküle, die notwendig sind, um 1 cm^2 Polyesteroberfläche zu belegen, ergibt sich aus Gleichung 7-7.

$$n_E = \frac{1}{4} r^{-2} \quad \text{Gleichung 7-7}$$

n_E Anzahl der Enzyme

Die daraus resultierende Masse an Enzym liefert Gleichung 7-8.

$$m_E = \frac{n_E \cdot M_E}{N_A} \quad \text{Gleichung 7-8}$$

m_E Masse an Enzym (g)
 M_E Molekulargewicht des Enzyms (g mol^{-1})
 N_A Avogadro-Konstante ($6,0221415 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

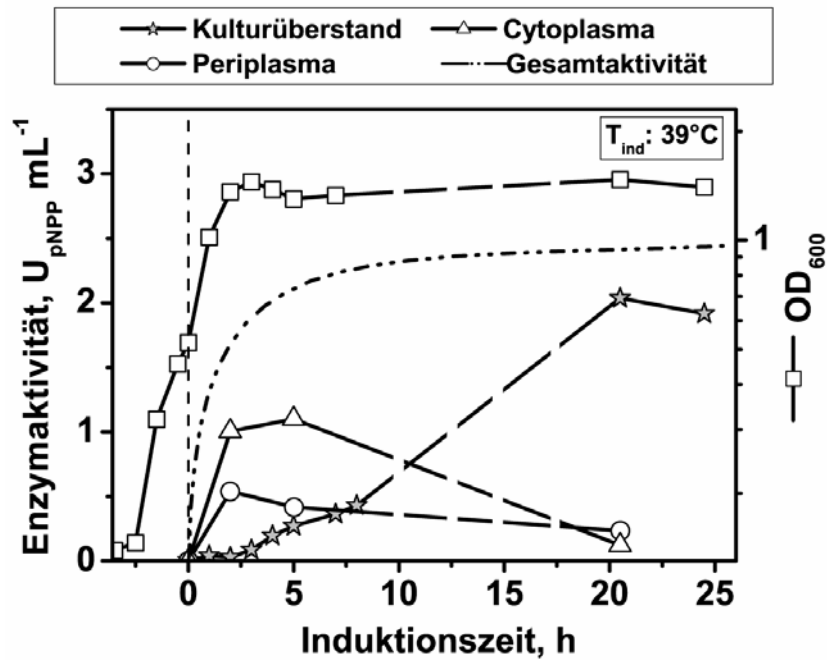


Abb. 7-1: Der Kultivierungsverlauf und die heterologe Genexpression der rekombinanten Tfh in *E. coli* TG1: pCYTEXP1-OmpA-bta1-His₆ in einer Schüttelkultur mit M9-Minimalmedium vor und nach erfolgter Induktion. Vor Induktionsbeginn (gestrichelte Linie) erfolgte die Kultivierung bei 30 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,6. Die Induktion der rTfh Produktion wurde durch eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 30 °C auf 39 °C initiiert.

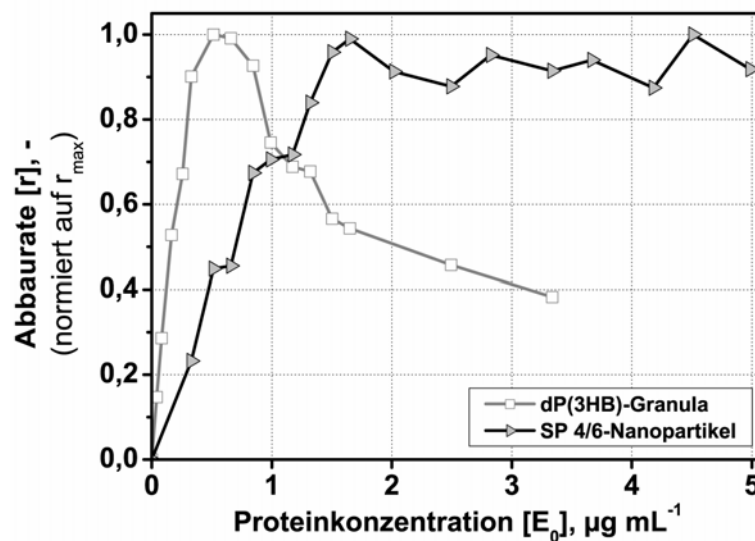


Abb. 7-2: Normierter Abbau der dP(3HB)-Granula (1mg, Ø 1,39 µm, 36 cm²) und SP 4/6-Nanopartikel in Abhängigkeit von der eingesetzten PhaZ5-Gesamtenzymkonzentration. Messungen wurden in milliQ-H₂O bei pH 8,0 und 37 °C durchgeführt.

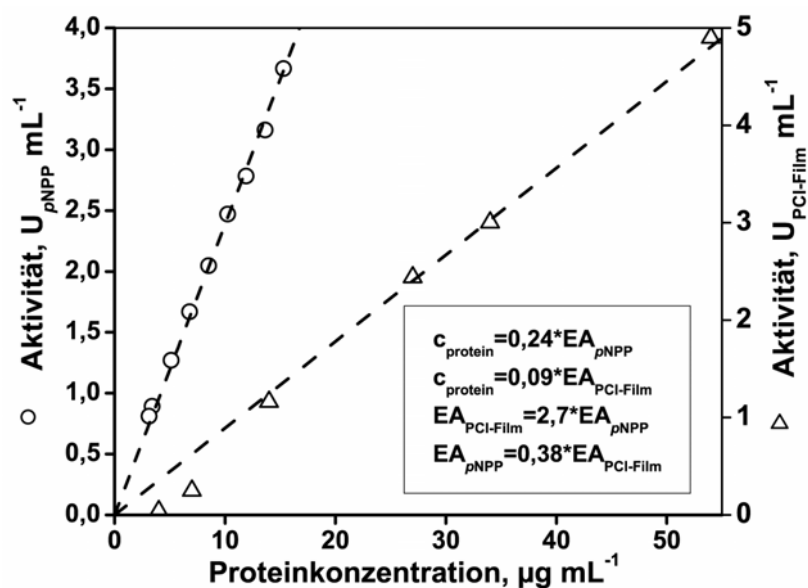


Abb. 7-3: rTfH-Aktivität gegenüber pNPP und PCL-Filmen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Der pNPP-Enzymtest wurde bei 25 °C (Kap. 4.8.3.1.1) durchgeführt, der Abbau der PCL-Filme bei 55 °C entsprechend dem Protokoll nach Gouda et al. [2002]. Der aus der Steigung beider Geraden ermittelte Kalibrierfaktor konnte zur Umrechnung der TfH-Ausbeuten aus den Kultivierungen mit *T.fusca* bzw. *E.coli* herangezogen werden.

Tab. 7-1: wTfH Produktion in 100 L Kultivierung mit *T. fusca* [Gouda et al. 2002].

	Wildtyp-TfH, Batchkultivierung ¹
Prozessparameter	T=55 °C, pH=7,0, $V_{\text{Reaktor}}=100 \text{ L}$, Induktor: 312,5 g Polyester
Induktionsdauer, h	48
Vol. Aktivität, $10^3 U_{pNPP} \text{ L}^{-1}$	4
Vol. Produktivität $10^3 U_{pNPP} (\text{Lh})^{-1}$	0,08

¹Die volumetrischen Aktivitäten in $U_{PCL-Film} \text{ mL}^{-1}$ wurden $U_{pNPP} \text{ mL}^{-1}$ umgerechnet (Anhang: Abb. 7-3)